

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in lymphoblastoiden
Zellen von Patienten mit Nijmegen-Breakage-Syndrom

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Thierfelder

aus Bremen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Digweed
2. Prof. Dr. D. Schindler
3. Prof. Dr. B. Kaina

Datum der Promotion: 28.04.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Entstehung von DNA-Schäden	1
1.2 Konsequenzen von DNA-Schäden und Störungen in deren Reparatur	1
1.2.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	3
1.2.2 Zellzykluskontrolle und Apoptose	4
1.3 Das Nijmegen-Breakage-Syndrom	9
1.3.1 Klinisches Bild des Nijmegen-Breakage-Syndroms	11
1.3.2 Zellulärer NBS-Phänotyp	13
1.3.3 Molekulare Grundlagen	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material	20
2.1 Zelllinien	20
2.2 Zellkulturmedien	21
2.3 Chemikalien	21
2.4 Enzyme	22
2.5 Lösungen und Puffer	22
2.6 Geräte	23
2.7 Fertige Kits	24
2.8 Verbrauchsmaterialien	24
2.9 Computeranwendungen	24
3 Methoden	26
3.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen	26
3.2 Zellzahlbestimmung	27
3.3 Chromosomenanalyse	28
3.4 DNA-Extraktion aus lymphoblastoiden Zellen	29
3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.5.1 Nachweis der Zellgleichheit	30
3.5.2 Gelelektrophorese der PCR-Produkte	30
3.5.3 Mycoplasmentest	31
3.6 Mutationsnachweis durch Sequenzierung	32
3.6.1 Reinigung der PCR-Produkte	32
3.6.2 Ansatz der Sequenzierreaktion	33
3.7 Wachstumsexperimente	34
3.8 Mutagene	35
3.8.1 Bleomycin	35
3.8.2 Cyclophosphamid	36
3.8.3 Methotrexat	36
3.9 Wachstumsinhibitions-Experimente	36
3.10 Induktion der Apoptose in NBS-Zellen	37
3.10.1 Bleomycinbehandlung	37

3.10.2 Apoptosenachweis mit der sub-G ₁ -peak-Methode	38
3.10.3 Apoptosenachweis mittels Annexin-V-Färbung	39
3.11 Grundlagen der Durchflusszytometrie	40
3.11.1 Aufbau und Funktionsweise des Durchflusszytometers	40
3.11.2 Probenmessung und Datenauswertung	41
3.12 Statistik	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Mutationsnachweis durch Sequenzierung	43
4.2 Wachstumscharakteristika von NBS-Zellen	44
4.2.1 Ermittlung der Ausgangszellzahl für die Apoptoseversuche	44
4.2.2 Wachstum von NBS-Zellen	45
4.3 Wachstumsinhibition von NBS-Zellen	47
4.4 Induktion der Apoptose in NBS-Zellen	50
4.4.1 Etablierung der Standardbedingungen für die Apoptoseversuche ..	50
4.4.2 Apoptosenachweis mit der sub-G ₁ -Peak-Methode	53
4.4.3 Apoptosenachweis mit der Annexin-V-Färbung	57
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	61
5 Diskussion	63
5.1 In-vitro Untersuchungen an Patientenzellen	63
5.2 Wachstum von NBS-Zellen	64
5.3 Wachstumsinhibition von NBS-Zellen	66
5.4 Apoptoseinduktion in NBS-Zellen	68
5.4.1 Nachweisverfahren	68
5.4.2 Apoptosefähigkeit von NBS-Zellen	70
5.5 Die Rolle von Nbs1	83
6 Zusammenfassung	85
Literaturverzeichnis	88
Erklärung an Eides Statt	102
Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

AILD	angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
ALL	akute lymphatische Leukämie
AT	Ataxia teleangiectasia
ATM	Ataxia teleangiectasia, mutated
ATR	ATM and Rad3-related
Ax	Annexin
BLM	Bleomycin
bp	Basenpaar
BRCT	breast cancer carboxy terminal
Chk2	Checkpoint-Kinase 2
CPA	Cyclophosphamid
DLBL	diffuse large B-cell-lymphoma
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie
FHA	fork-head-associated
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FL	Fluorescence
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
HPV-16	humanes Papillomavirus 16
HR	homologe Rekombination
kb	kilo Basen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	kilo Dalton
LD	letale Dosis
MEF	mouse embryonic fibroblast (embryonale Maus-Fibroblasten)
MNNG	N-methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidin
M/R/N	Komplex aus Mre11, Rad50 und Nbs1
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MTX	Methotrexat
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
Nbs1	Gen des Nijmegen-Breakage-Syndroms
NHEJ	Non-homologous end joining
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pen	Penicillin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnliche Kinase
PS	Phosphatidylserin
RDS	radioresistente DNA-Synthese
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serinrest
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Strep	Streptomycin
SV40	Simian Virus 40
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
V.	Version
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

1 Einleitung

1.1 Entstehung von DNA-Schäden

Das Erbmateriale aller lebenden Organismen ist kontinuierlich chemischen und physikalischen Reizen ausgesetzt, die es schädigen oder in seiner Funktion beeinträchtigen. Diese Schädigungen können sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein.

Endogen wirken Sauerstoffradikale, die durch Oxidationsprozesse im Zellstoffwechsel entstehen, potentiell DNA-schädigend. Über 100 verschiedene DNA-Modifikationen durch Oxidierung sind bisher beschrieben [Cadet et al., 2003]. Zu den exogen einwirkenden Noxen zählen ionisierende Strahlung, mutagene Chemikalien und ultraviolette Strahlung.

Die sofortige Erkennung und effektive Reparatur derartig entstandener Läsionen oder aber die gezielte Elimination geschädigter Zellen durch programmierten Zelltod ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität der Zelle. Blieben die Veränderungen unerkannt und akkumulierten in der DNA, hätte dies in Form von Mutationen fatale Folgen für die Zelle. Wie alle Lebewesen verfügt der Mensch deshalb über eine Reihe von Mechanismen, die entstandene Schäden erkennen und reparieren. Mehrzellige Organismen haben zudem die Möglichkeit, irreparabel geschädigte Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose, zu leiten.

1.2 Konsequenzen von DNA-Schäden und Störungen in deren Reparatur

DNA-Schäden bergen die Gefahr von Mutationen, die zur Störung der Genwirkung und zum Verlust der zellulären Homöostase führen können. Für einzellige Organismen bedeutet dies in der Regel den Zelltod. Bei mehrzelligen Organismen hingegen, deren verschiedenartig differenzierte Gewebe eine präzise Regulation des Zellwachstums erfordern, können Veränderungen dieses sensiblen Gleichgewichts zu ungesteuerter Zellteilung führen. Eine gesteigerte zelluläre Mutationsrate, z. B. durch Mutagene oder den Ausfall von DNA-Reparatur-Mechanismen verursacht, führt so zu einem erhöhten Krebsrisiko. KINZLER und VOGELSTEIN erklärten bereits 1997 das Zusammenspiel von DNA-Reparatur und Krebsentstehung [Kinzler und Vogelstein, 1997].

Den Autoren zu Folge gibt es zwei Gruppen von Genen, die für die Krebsentstehung wichtig sind: die *Caretakers* (dt. 'Hausmeister') und die *Gatekeepers* (dt. 'Schrankenwärter'). Während die *Caretakers* als DNA-Reparatur-Enzyme für die Instandhaltung der DNA verantwortlich sind, kontrollieren die *Gatekeepers* die Progression des Zellzyklus, um die Weitergabe fehlerhafter Erbinformation zu verhindern. Defekte in der Funktion dieser zwei Genklassen haben unterschiedliche Auswirkungen (vgl. Abb. 1). Überlastung oder Ausfall der *Caretakers* führt zu einer erhöhten Mutationsrate. Solange die *Gatekeepers* noch intakt sind, werden derartig geschädigte Zellen erkannt und durch Apoptose eliminiert. Erst der zusätzliche Ausfall eines *Gatekeepers* führt nach diesem Modell zu unkontrolliertem Zellwachstum und bildet den ersten Schritt zur Tumorentstehung.

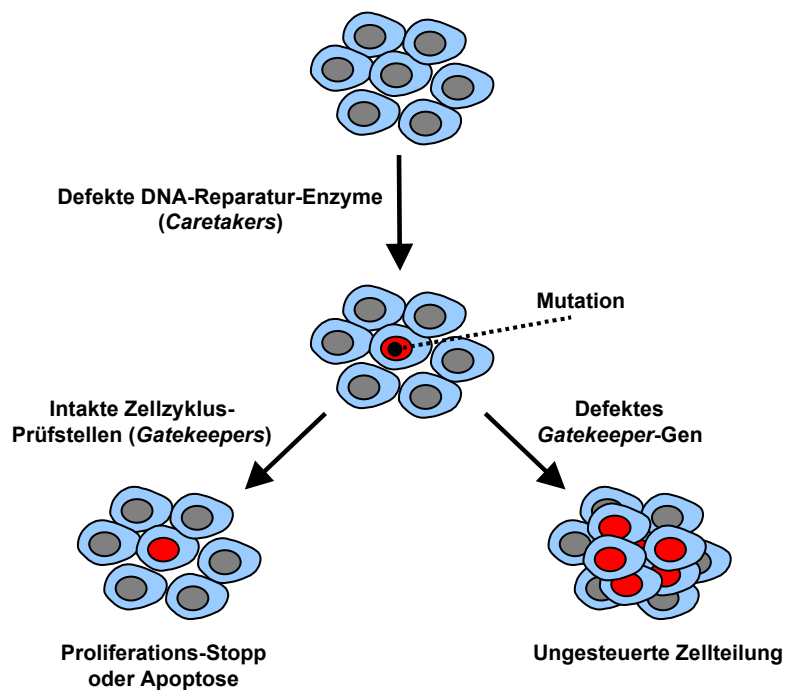


Abb. 1: DNA-Reparatur, Apoptose und Krebsentstehung. Defekte *Caretakers* führen zur Anhäufung von Mutationen. Solange die *Gatekeeper*-Gene noch intakt sind, können die Mutationen erkannt und die mutierte Zelle unschädlich gemacht werden. Sind jedoch auch die *Gatekeepers* defekt, kann sich die veränderte Zelle ungesteuert teilen [Abb. modifiziert nach Kinzler und Vogelstein, 1997].

Angeborene Gen-Defekte beider Klassen gehen demnach mit einem erhöhten Krebsrisiko einher. So führt z. B. die Mutation eines *Caretakers*, einem Enzym der Nukleotid-Exzisionsreparatur, zum Krankheitsbild der Xeroderma pigmentosum.

Betroffene sind überempfindlich gegenüber UV-Strahlung und haben ein stark erhöhtes Risiko, an Hautkrebs zu erkranken [Stary und Sarasin, 2002]. Das Li-Fraumeni-Syndrom beruht dagegen auf Mutationen im Tumorsuppressorgen p53, das die Funktion eines Gatekeepers hat [Malkin et al., 1990]. Die betroffenen Patienten entwickeln frühzeitig verschiedenartige Tumore [Li und Fraumeni, 1969].

1.2.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Angesichts der verschiedenartigen DNA-Läsionen – Einzel- und Doppelstrangbrüche, fehlerhafte Basen – muss es mehr als nur einen Caretaker-Reparaturmechanismus geben. Im Laufe der Evolution hat sich deshalb ein ausgefeiltes, verwobenes Netz an Reparatursystemen entwickelt, das fast alle Schäden beseitigen kann. Besondere Bedeutung kommt dabei der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) zu, da sie die für die Zelle potentiell gefährlichste Form der DNA-Schädigung darstellen. Ein einziger unreparierter Doppelstrangbruch kann bereits zum Tod der Zelle führen [Blocher und Pohlitz, 1982].

Die Besonderheit der DSB liegt darin, dass sie nicht nur durch exogene Noxen, allen voran die ionisierende Strahlung, verursacht werden, sondern auch als notwendige Zwischenprodukte physiologischer Vorgänge entstehen. Hierzu zählen die genetische Rekombination während der Meiose und die V(D)J-Rekombination der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene während der B- und T-Zell-Reifung. Eine weitere Quelle von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt die DNA-Replikation selbst dar. Trifft die Replikationsgabel während der Replikation auf ein Hindernis, z. B. eine DNA-Interstrangvernetzung oder einen Einzelstrangbruch, können als Folge Doppelstrangbrüche entstehen.

Das häufige Vorkommen einerseits und die große Gefahr, die DSB für die Zelle darstellen, andererseits, haben zur Entwicklung effektiver DSB-Reparaturmechanismen in eukaryotischen Zellen geführt. Zwei Hauptwege sind dabei bekannt; die homologe Rekombination (HR) und die Verknüpfung freier DNA-Enden (non-homologous end joining, NHEJ). Beide Mechanismen spielen auch bei physiologischen Prozessen wie der V(D)J-Rekombination und der Keimzellbildung eine wichtige Rolle [Ivanov et al., 1992; Lieber, 1999].

Bei der HR wird ein homologer Chromosomenabschnitt – in der Regel die Schwesterchromatide – als Matrize für die Reparatur verwendet. Dies erklärt, warum

dieser Prozess der S- und der G2-Phase des Zellzyklus vorbehalten ist, denn in diesen Phasen befindet sich die neu synthetisierte, identische Erbinformation in unmittelbarer Nähe. Das Prinzip der HR beruht zunächst auf der Prozession des DSB zu einem Einzelstrang mit 3'-Überhang mittels einer Nuklease. Die entstandenen 3'-Enden lagern sich an die intakte homologe Doppelhelix an und eine DNA-Polymerase kopiert die korrekte Basenabfolge. Zuletzt wird die Überkreuz-Struktur ('Holliday-Junction') durch eine Resolvase wieder aufgelöst. Diesen Reparaturmechanismus findet man vorwiegend bei niederen Eukaryonten wie der Hefe [Ratray und Symington, 1995].

Im Gegensatz zur HR benötigt das NHEJ keinen homologen Partner, wodurch es zellzyklusunabhängig durchgeführt werden kann [Takata et al., 1998]. Es beruht auf der Prozessierung und nachfolgenden schlichten Verknüpfung der durch den DSB entstandenen freien DNA-Enden. Generell ist dieser Mechanismus ungenauer als die HR, da kleine Deletionen in Kauf genommen werden müssen. Da allerdings nur ca. 2% des menschlichen Genoms kodierende Funktion besitzt, werden diese Mikrodeletionen im Allgemeinen gut toleriert. Das NHEJ findet auch bei den Umbauten der Immunglobulingene statt und stellt in Säugetieren den Hauptreparaturweg für Doppelstrangbrüche dar.

1.2.2 Zellzykluskontrolle und Apoptose

Um Zeit für die DNA-Reparatur zu gewinnen, muss die Zelle nach einer DNA-Schädigung den Generationszyklus kurzfristig stoppen. Dies ist Aufgabe der Gatekeeper. Fiele diese Kontrolle weg, wären unkoordiniertes Zellwachstum und die Weitergabe potentiell krebserzeugender Mutationen an Tochterzellen die Folge.

In der G1-Phase ist die Zelle besonders stoffwechselaktiv und vollbringt die für sie typischen Leistungen und Funktionen. Der Chromosomensatz liegt in diploider Form vor. Ein Teil der Zellen verliert in der G1-Phase die Fähigkeit, sich auch weiterhin mitotisch zu teilen; diese Zellen gehen in die G0-Phase über und scheiden aus dem Generationszyklus aus (vgl. Abb. 2). In der S-Phase wird die genetische Information für die Zellteilung verdoppelt. In der sich anschließenden G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die darauf folgende Mitose vor, indem sie energiereiche Substanzen in das Zytoplasma einlagert. Im Verlauf der Mitose wird das zuvor identisch replizierte Genom gleichmäßig auf die beiden entstehenden Tochterzellkerne verteilt.

Ein komplexes Netzwerk verschiedener interagierender Faktoren ist an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Vermutlich beinhaltet es mindestens drei Kontrollpunkte (Checkpoints), an denen die Zelle den fehlerfreien Ablauf der Zellteilung überprüft und ggf. – z. B. im Falle vorhandener Doppelstrangbrüche – den Eintritt in die nächste Phase verzögert, um zunächst den Schaden zu beseitigen (vgl. Abb. 2). Während der G1/S- und der Intra-S-Checkpoint die Replikation geschädigter DNA verzögern oder gar verhindern, sorgt der G2/M-Checkpoint dafür, dass veränderte Informationen nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden.

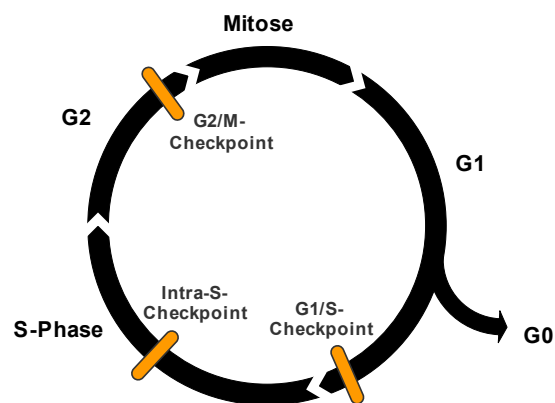


Abb. 2: Die Phasen des Zellzyklus. Der Übergang von einer Phase in die folgende wird an mindestens drei Checkpoints kontrolliert.

Ist eine vorliegende DNA-Schädigung zu ausgedehnt, als dass die Mechanismen des Zellzyklusarrests und der DNA-Reparatur noch greifen könnten, wird in der Zelle der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet. Hierbei handelt es sich um einen komplex regulierten, in der Evolution hoch konservierten Vorgang, der für den Erhalt der genomischen Stabilität der Zelle und die Prävention der Tumorentstehung unabdingbar ist. Er befähigt den Organismus, einzelne Zellen planmäßig zu eliminieren. Zahlreiche interne und externe Faktoren können das Apoptoseprogramm auslösen [Collatz, 2001]. Hierzu gehören z. B. der Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Wirkung von TNF α und Glukokortikoiden. Ionisierende Strahlung und Zytostatika wirken über die Induktion von DNA-Schäden pro-apoptotisch.

Lichtmikroskopisch erkennt man apoptotische Zellen an charakteristischen morphologischen Veränderungen wie Bläschenbildung der Plasmamembran (membrane blebbing) und Abschnürung kleiner Vesikel (Apoptosekörperchen), Zellschrumpfung und Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie Chromatinverdichtung und

den Zerfall des Zellkerns in basophile Körper (vgl. Abb. 3). Die Zellüberreste werden rasch von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen; es kommt nicht zur Entzündungsreaktion oder Antikörperbildung. Während bei diesem Vorgang die Ultrastruktur der Zellorganellen und der Zellmembran erhalten bleiben, wird die DNA systematisch durch Endo- und Exonukleasen abgebaut [Wyllie, 1980]. Die dabei entstehenden charakteristischen DNA-Bruchstücke von ca. 180bp können angefärbt dem Apoptosenachweis dienen.

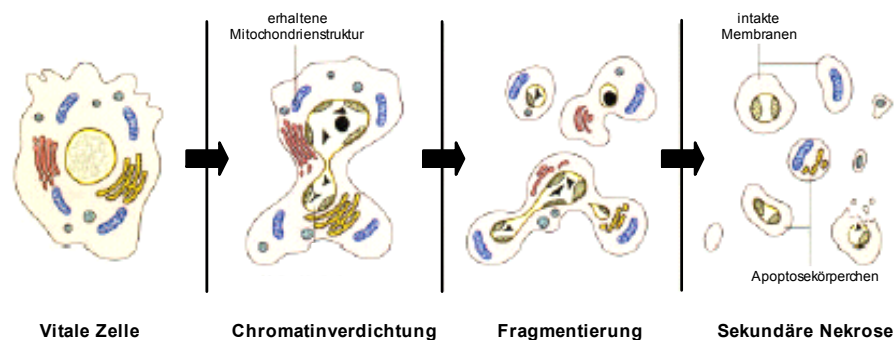


Abb. 3: Morphologischer Verlauf der Apoptose [Abb. modifiziert nach o.V., 2004, Roche Applied Science].

Im Gegensatz zur Apoptose zeichnet sich die Nekrose durch eine anfängliche Zellschwellung und den späteren Verlust der Zellmembranintegrität aus. Durch den Austritt lytischer Enzyme und Botenstoffe führt dies zur Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe (vgl. Abb. 4).

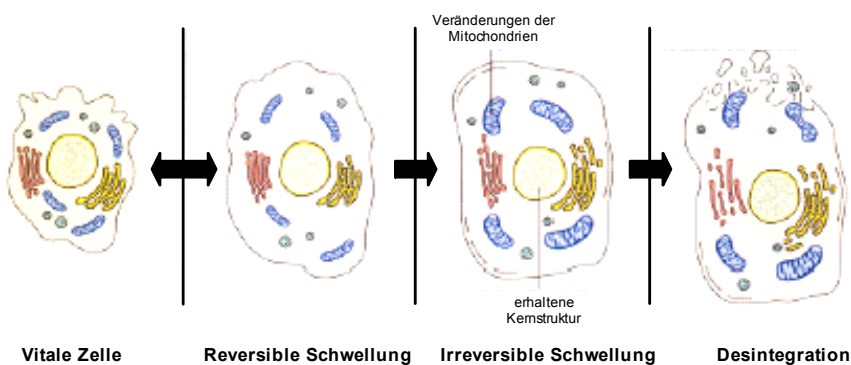


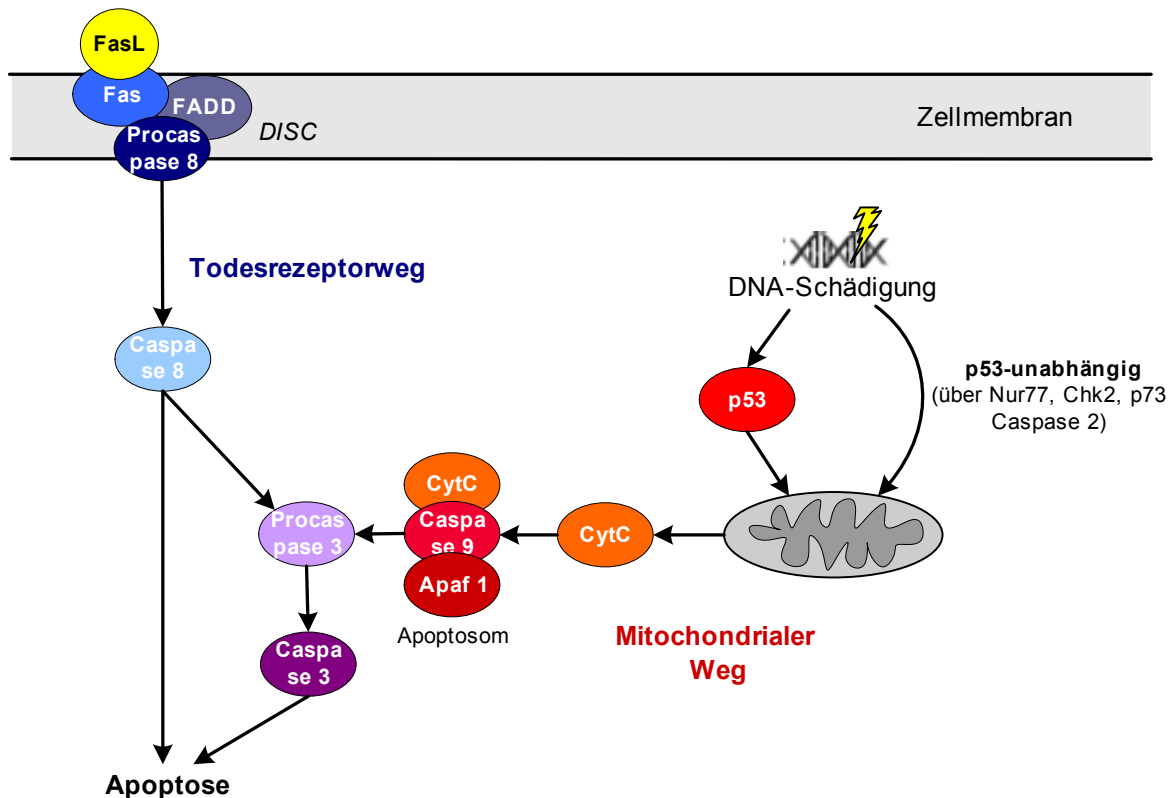
Abb. 4: Morphologischer Verlauf der Nekrose [Abb. modifiziert nach o.V., 2004, Roche Applied Science].

Aus biochemischer Sicht gelten zwei Wege zur Induktion der Apoptose als gesichert: der Todesrezeptorweg (*death receptor pathway*) und der mitochondriale Weg (vgl.

Abb. 5). Beide münden in die Aktivierung cysteinabhängiger, aspartatspezifischer Proteasen, so genannter Caspasen. Sie sind die zentralen Effektorenzyme der Apoptose, die die Zelle zerlegen [Thornberry und Lazebnik, 1998]. Bis heute sind 15 verschiedene Caspasen in Säugetierzellen identifiziert worden [Joza et al., 2002].

Beim Todesrezeptorweg binden Liganden an auf der Zelloberfläche liegende Rezeptoren (z. B. *CD95/Fas*, *TNF1-Rezeptor*, *Death Receptor 3*) [Hengartner, 2000; Nagata und Golstein, 1995]. Die Rezeptoren aggregieren und bilden den so genannten *Death Inducing Signalling Complex (DISC)* [Ashkenazi und Dixit, 1998], der über den Adapter FADD (*FAS-associated death domain protein*) die Caspasen 8 und 3 aktiviert.

Der mitochondriale Weg wird überwiegend durch intrazelluläre Stimuli wie DNA-Schäden, Glukokortikoide oder Störungen im Redoxgleichgewicht ausgelöst. Eine zentrale Rolle spielt hier der Tumorsuppressor p53, dessen Gehalt in der Zelle innerhalb von Minuten nach einer DNA-Schädigung ansteigt [Vogelstein et al., 2000; Zhan et al., 1993]. p53 führt unter anderem zur Aktivierung von Proteinen der bcl-2-Familie und der BAX-Subfamilie, die sich daraufhin an die äußere Mitochondrienmembran heften und zur Freisetzung von Cytochrom C führen [Adams und Cory, 1998]. Dies bewirkt die Ausbildung des so genannten Apoptosoms – einem Komplex aus Cytochrom C, Apaf-1 und Caspase 9 [Cain et al., 1999] – der wiederum die Caspase 3 aktiviert, dem gemeinsamen Endmolekül beider Apoptosewege. Abbildung 5 zeigt den Ablauf beider Wege im Überblick.



Apaf 1: Apoptotic protease activating factor, Chk2: Checkpoint-Kinase 2, CytC: Cytochrom C, FADD: Fas-associated death domain protein, FasL: Fas-Ligand, Nur77: Nuclear Hormone Receptor TR53.

Abb. 5: Zwei Wege der Apoptoseinduktion sind bekannt: Beim Todesrezeptorweg (extrazellulär) wird der Oberflächenrezeptor Fas durch Bindung entsprechender Liganden (FasL) aktiviert. Dies führt zur Ausbildung eines membrangebundenen Death Inducing Signalling Complex (DISC), bestehend aus FADD, Fas und Procaspase 8. Der DISC aktiviert 'Downstream'-Caspasen, die die Zelle zerlegen. Der mitochondriale Weg wird durch intrazelluläre Stimuli wie z. B. DNA-Schädigung ausgelöst und p53-abhängig oder -unabhängig an die Mitochondrien übermittelt. Über Freisetzung von CytC kommt es zur Ausbildung des Apoptosoms, das wiederum die Procaspase 3, das gemeinsame Endmolekül beider Apoptosewege, aktiviert [Abb. modifiziert nach Hengartner, 2000].

Auch p53-unabhängige Apoptose ist beschrieben worden [Han et al., 1995; Seki et al., 1994]. So können Nur77 [Li et al., 2000], Caspase 2 [Tinel und Tschopp, 2004], p73 [Melino et al., 2004] oder Chk2 [Yang et al., 2002] auch ohne das Mitwirken von p53 das Apoptoseprogramm auslösen (vgl. Abb. 5).

Die Apoptose unterliegt einer strengen und komplexen Kontrolle durch Gatekeeper-Gene. Ungleichgewichte im Netzwerk pro- und antiapoptotischer Faktoren haben fatale Folgen für die Zelle. So wurden Erkrankungen wie Parkinson, Rheuma, Aids oder Herzerkrankungen bereits in Zusammenhang mit übermäßiger Apoptose gestellt.

Demgegenüber spielt der Verlust der Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung [Igney und Krammer, 2002].

Auch wenn zahlreiche an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, der Zellzykluskontrolle und der Apoptoseregulation beteiligte Gene bereits identifiziert wurden, ist man von einem eigentlichen Verständnis, wann welcher 'pathway' in der Zelle eingeschlagen wird, weit entfernt. Dies hängt nicht zuletzt damit zusammen, dass einzelne Gene in mehrere Schritte involviert sein und sehr komplexe Rückkopplungsmechanismen vorliegen können. Es sollte daher anstelle von 'pathways' besser von einem Netzwerk der Genwirkung gesprochen werden. Ein derartiges, evolutionär entstandenes Netzwerk zeichnet sich auch durch seine Pufferwirkung aus: Der Ausfall eines Gens kann von anderen kompensiert werden.

1.3 Das Nijmegen-Breakage-Syndrom

Welch weitreichende Folgen eine genetisch bedingte Störung der zellulären Antwort auf DNA-Schäden für den Organismus haben kann, zeigt sich bei Betroffenen des Nijmegen-Breakage-Syndroms.

Mit weltweit ca. 100 betroffenen Familien ist das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) eine seltene Erkrankung. Die höchste Prävalenz findet sich in Osteuropa, insbesondere in Polen, Tschechien und der Ukraine. In Tschechien liegt die Heterozygotenfrequenz bei ca. 1:150 [Varon et al., 2000]. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und zählt mit der Ataxia teleangiectasia (AT), dem Bloom's-Syndrom und der Fanconi-Anämie zur Gruppe der erblichen Chromosomenbruchsyndrome. Bei diesen Erkrankungen beobachtet man auf zellulärer Ebene eine erhöhte spontane sowie durch spezifische Mutagene induzierbare Brüchigkeit der Chromosomen.

Erstmals 1981 beschrieben [Weemaes et al., 1981], hielt man die Krankheit aufgrund zahlreicher Übereinstimmungen sowohl im klinischen Erscheinungsbild als auch auf zellulärer Ebene zunächst für eine Variante der AT (AT-V) (vgl. Tab. 1) [Jaspers et al., 1988]. Diese Ansicht wurde durch Kopplungsanalysen in Frage gestellt, in denen die AT-Region als NBS-Genort ausgeschlossen werden konnte [Stumm et al., 1995]. Mit der Lokalisation des NBS-Gens auf Chromosom 8q21 stand endgültig fest, dass es sich bei AT und NBS um genetisch distinkte Erkrankungen handelt [Saar et al., 1997]. Gestützt auf die Methode der Positionsklonierung konnte das dem NBS zugrunde

liegende Nbs1-Gen 1998 von zwei Arbeitsgruppen zeitgleich identifiziert werden [Matsuura et al., 1998; Varon et al., 1998].

Tab. 1: Klinische und zelluläre Merkmale von Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) und Ataxia teleangiectasia (AT).

Merkmal	NBS	AT
Klinisch		
erhöhtes Krebsrisiko	++	+
Strahlenempfindlichkeit	+	+
Immundefizienz	+	+
ovarielle Dysgenese	+	+
Hyperpigmentierung	+	(+)
Wachstumsretardierung	+	(+)
Mikrozephalie	+	-
mentale Retardierung	(+)	-
charakteristische Fazies	+	-
Ataxie	-	+
zerebelläre Degeneration	-	+
Teleangiektasien d. Konjunktiven	-	+
erhöhtes α -Fetoprotein	-	+
Zellulär		
chromosomale Instabilität	++	+
Strahlenempfindlichkeit	+	+
radioresistente DNA-Synthese	+	++
Zellzyklus-Defekte	+	+

Beide Genprodukte, ATM (Ataxia teleangiectasia mutated) und Nbs1, sind nach einer DNA-Schädigung an den beiden wichtigen zellulären Schutzmechanismen DNA-Reparatur und Zellzyklusarrest beteiligt [Digweed und Sperling, 2004; Shiloh, 2003].

Ogleich über die Wechselwirkungen von Nbs1 und ATM und deren Bedeutung im Einzelnen noch viele Unklarheiten bestehen, kann heute doch von einer engen Zusammenarbeit beider Proteine zur Erhaltung der genomischen Stabilität und dem Schutz vor maligner Entartung ausgegangen werden.

1.3.1 Klinisches Bild des Nijmegen-Breakage-Syndroms

Die Ausprägung des Nijmegen-Breakage-Syndroms ist sehr variabel [The International Nijmegen-Breakage-Syndrome Study Group, 2000]. Zu den Hauptmerkmalen der Erkrankung zählen die schwere Mikrozephalie, kombiniert mit Entwicklungsverzögerung, Immundefizienz und einem erhöhten Krebsrisiko [Seemanova et al., 1985]. Lebensbegrenzend sind die meist schon im Jugendalter auftretenden malignen Lymphome, angeführt von der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome.

Phänotypisch zeigen NBS-Patienten eine charakteristische kraniofaziale Dysmorphie. Parallel zur Mikrozephalie entwickelt sich ein prominentes Mittelgesicht mit langer Nase und breitem Philtrum. Weiterhin fallen dünnes Haar, eine fliehende Stirn, Mikrogenie sowie tiefsitzende Ohrmuscheln auf.



Abb. 6: Geschwisterpaar mit Nijmegen-Breakage-Syndrom. Das Bild wurde freundlicherweise von Prof. Dr. E. Seemanova (Prag) zur Verfügung gestellt.

75% der Patienten zeigen bereits bei der Geburt eine Mikrozephalie, die sich bei 25% erst innerhalb der ersten Lebensmonate manifestiert. Im kranialen MRT finden sich verkleinerte Frontallappen kombiniert mit einer Einengung der lateralen Ventrikel [Bekiesinska-Figatowska et al., 2000; Van de Kaa et al., 1994]. Als Ursache der Mikrozephalie werden ein reduziertes Gehirnwachstum und die vorzeitige Fusion der Schädelknochen diskutiert. Die geistige Entwicklung ist bei 35% der Patienten normal, bei 45% zeigt sich ein IQ im unteren Normbereich, 20% zeigen eine mäßige Retardierung.

Eines der Hauptmerkmale des NBS ist der Minderwuchs. Während Geburtsgewicht und -länge noch im Normbereich liegen, fällt die Körpergröße im Laufe der Entwicklung unter die 10. Perzentile. Im Alter von zwei Jahren liegt in der Regel bereits ein manifester Kleinwuchs vor. Das Körpergewicht verhält sich dabei proportional zur Körperlänge [Chrzanowska et al., 1995].

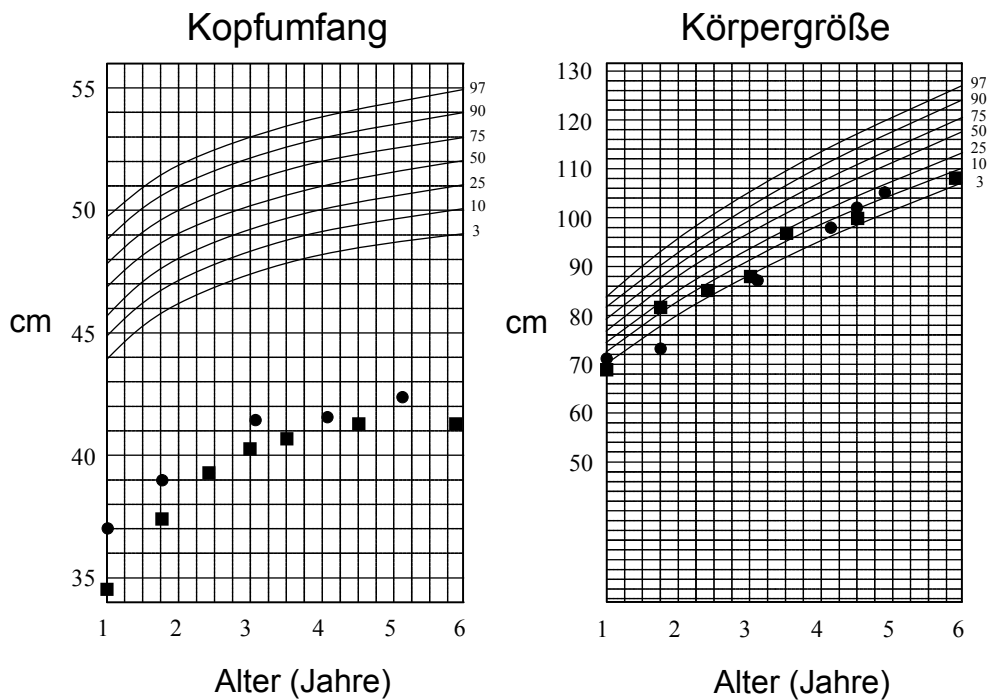


Abb. 7: Kopfumfang und Längenwachstum zweier männlicher NBS-Patienten. Abbildung der Daten mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. E. Seemanova (Prag).

An Hautmanifestationen sind Vitiligo, Café-au-lait-Flecken sowie sklerale Teleangiectasien beschrieben.

Immunologisch finden sich eine gestörte humorale und zelluläre Immunität. Allerdings variiert auch hier die Ausprägung stark. So sind etwa 10% der Patienten hinsichtlich des Immunglobulinstatus unauffällig [Gregorek et al., 2002; Weemaes et al., 1994]. Die Mehrheit der Patienten weist jedoch einen selektiven oder kombinierten IgG- und IgA-Mangel auf [van Engelen et al., 2001]. Bis zu einem Drittel der Fälle imponieren mit einer Agammaglobulinämie. Die zelluläre Immunität ist bei mehr als 90% der Patienten eingeschränkt. Dies zeigt sich in einer milden bis mäßigen Lymphopenie, niedrigen CD3+- und CD4+-Helferzellspiegeln und einer reduzierten CD4+/CD8+ Suppressorzellratio. *In vitro* ist die T-Lymphozytenproliferation nach Mutagenbehandlung ebenfalls

gestört [Weemaes et al., 1994]. Klinisch kommt es zu rezidivierenden Infektionen der oberen und unteren Atemwege. Harnwegs- und gastrointestinale Infekte treten gehäuft auf.

Das Risiko, an Krebs zu erkranken, ist bei NBS-Patienten stark erhöht [Seemanova et al., 1985]. Etwa 40% der Patienten entwickeln bereits bis zum 20. Lebensjahr eine bösartige Neubildung, wobei Lymphome an erster Stelle stehen. 18 von 48 registrierten polnischen Patienten erkrankten schon vor dem 15. Lebensjahr an einem malignen Lymphom. Auffällig ist zudem die für das Kindesalter unübliche Verteilung der Lymphome: Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), hier insbesondere das 'diffuse large B-cell-lymphoma' (DLBL), treten unverhältnismäßig häufig auf [Seidemann et al., 2000]. Ebenso das periphere T-Zell-Lymphom (AILD) – hier liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter in der Bevölkerung bei 61 Jahren – findet sich gehäuft unter NBS-Patienten. Lediglich vier NBS-Patienten sind bisher an für das Kindesalter *typischen* Neoplasien – der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) und dem Medulloblastom – erkrankt. Lange umstritten war die Frage, ob auch NBS-Heterozygote ein erhöhtes Krebsrisiko besitzen. Nach aktuellem Forschungsstand ist damit zu rechnen [Steffen et al., 2004].

1.3.2 Zellulärer NBS-Phänotyp

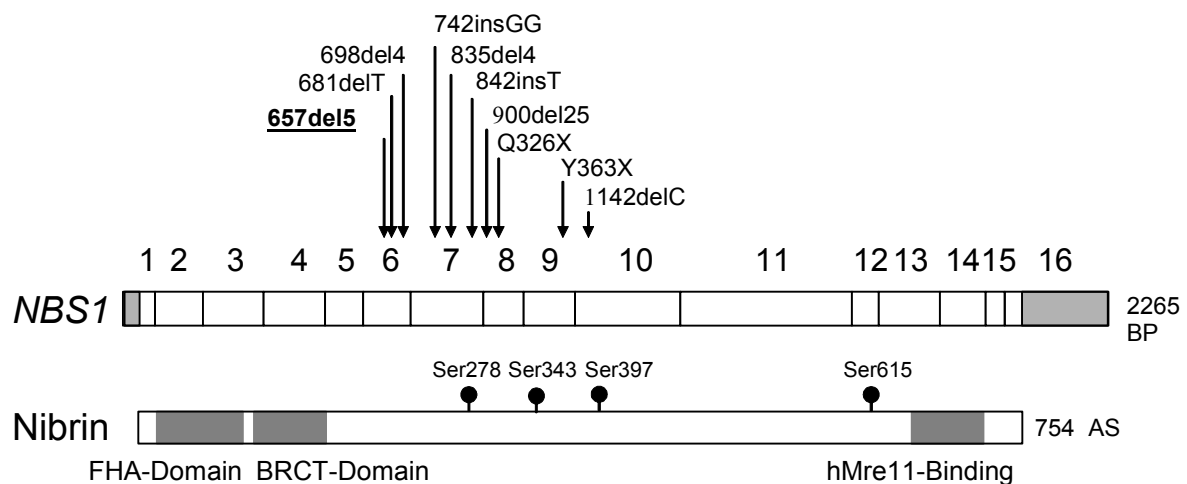
Auf zytogenetischer Ebene zeigt sich beim NBS eine erhöhte spontane Brüchigkeit der Chromosomen. Typisch sind dabei Rearrangements unter Beteiligung der Chromosomen 7 und 14, wobei die Bruchpunkte sich besonders häufig im Bereich der Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgene befinden [Chrzanowska et al., 1995; van der Burgt et al., 1996].

NBS-Patienten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung, deren therapeutische Anwendung für die Patienten lebensbedrohlich sein kann [Distel et al., 2003]. Auf zellulärer Ebene zeigt sich die Radiosensitivität durch eine im Vergleich mit Kontrollzellen mindestens doppelt so hohe Sterberate primärer und transformierter NBS-Patientenzellen nach Bestrahlung [van der Burgt et al., 1996]. Zudem ist die Rate an Chromosomenaberrationen in NBS-Zellen nach Bestrahlung verglichen mit Kontrollzellen drastisch erhöht, wobei es sich meist um Schäden vom Chromatid-Typ handelt [Antoccia et al., 1997; Antoccia et al., 1999; Taalman et al., 1983].

1.3.3 Molekulare Grundlagen

1.3.3.1 Das Nbs1-Gen

Das Nbs1-Gen liegt auf Chromosom 8q21, weist 16 Exons auf und erstreckt sich über 50kb. Sein Genprodukt, das Nibrin, besteht aus 754 Aminosäuren. Durch Sequenzvergleiche konnten zwei funktionelle Domänen identifiziert werden: eine 'breast cancer carboxy terminal'-Domäne (BRCT) und eine 'fork-head-associated'-Domäne (FHA). Solche Domänen sind in eukaryotischen Zellen häufig in Proteinen der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur enthalten, wobei die FHA-Domäne vermutlich bei der Wechselwirkung mit phosphorylierten Proteinen eine Rolle spielt [D'Amours und Jackson, 2002]. Hinweise auf eine eigene Kinaseaktivität gibt es bei Nibrin nicht.



AS: Aminosäuren, BP: Basenpaare, BRCT: breast cancer carboxy terminal, FHA: fork-head-associated, Ser: Serinrest

Abb. 8: Das Nbs1-Gen und sein Genprodukt, das Nibrin. Mutationen im Nbs1-Gen führen zum klinischen Bild des Nijmegen-Breakage-Syndroms. Bisher sind 9 verschiedene Mutationen bekannt. Die 657del5-Mutation ist mit über 90% bei NBS-Patienten am häufigsten.

Nibrin konnte als das menschliche Äquivalent des Hefe-DNA-Reparaturgens Xrs2 identifiziert werden [Carney et al., 1998]. Allerdings besteht nur eine sehr schwache Sequenzhomologie vom Nbs1 zum Hefegen. Zusammen mit den Proteinen Mre11 und Rad50 bildet es, homolog zum Xrs2 in der Hefe, ein Trimer (M/R/N), das in Caretaker-Funktion eine Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) spielt. Hierauf deutet unter anderem eine *in vitro* nachgewiesene Endo- und Exonukleasefunktion des

M/R/N-Komplexes hin, die bei der DSB-Reparatur eine Rolle spielen könnte [Paull und Gellert, 1998; Trujillo et al., 1998]. In der Hefe ist die Beteiligung des M/R/N-Komplexes an der Reparatur von DNA-DSB bekannt.

Über 90% der NBS-Patienten weisen im Nbs1-Gen die gleiche 5bp-Deletion (657del5) auf (vgl. Abb. 8) [Varon et al., 1998]. Daneben wurden 9 weitere Mutationen gefunden, die ebenfalls zum Abbruch der Translation nach den benachbarten BRCT- und FHA-Domänen führen [Digweed et al., 1999]. Alle gefundenen Mutationen liegen in der zentralen Region und betreffen weder die BRCT- noch die FHA-Domäne selbst (vgl. Abb. 8).

Obwohl man vollständiges, intaktes Nibrin in NBS-Zellen erwartungsgemäß nicht findet, werden zwei Proteinfragmente – ein N-terminales 26kDa und ein carboxyterminales 70kDa Peptid – variabel exprimiert [Maser et al., 2001]. Möglicherweise besitzen diese Fragmente eine Restfunktion. Dies könnte erklären, weshalb Nbs1-Mutationen des Menschen mit dem Leben vereinbar sind, während 'knock-out'-Mäuse, die in dem entsprechenden Gen Null-Mutationen besitzen, bereits im Embryonalstadium absterben.

1.3.3.2 *Nbs1 und DNA-Reparatur*

In der Hefe scheint der Komplex aus Mre11, Rad50 und Xrs2 sowohl am DNA-Reparaturmechanismus durch homologe Rekombination (HR) als auch durch Non-homologous end joining (NHEJ) beteiligt zu sein. Man nahm daher an, dass das entsprechende Trimer in menschlichen Zellen, M/R/N, ähnliche Funktionen besitzt. Nachdem HUANG ET AL. der Nachweis einer Beteiligung des Komplexes am NHEJ *in vitro* bereits 2002 gelungen war [Huang und Dynan, 2002], konnte dieser Befund jetzt erstmals auch *in vivo* bestätigt werden. KRACKER ET AL. konnten eine signifikante Verminderung des Ig-Klassenwechsels bei der Immunglobulinsynthese in NBS-Lymphozyten nachweisen [Kracker et al., 2005]. Kontrovers diskutiert wird zurzeit noch eine Beteiligung von M/R/N am Reparaturmechanismus der HR. Kürzlich konnten TAUCHI ET AL. in einer Nbs -/- Hühnerzelllinie mit Hilfe eines spezifischen Assays eine signifikante Verminderung der HR in den defekten Zellen nach Mitomycin-C-Behandlung nachweisen [Tauchi et al., 2002]. Da das Einbringen des intakten Gens jedoch nicht zur Korrektur des Defekts führte, bleibt die Signifikanz dieses Befundes umstritten. Zudem ist der verwendete Zelltyp genetisch außergewöhnlich instabil.

Aus den vorliegenden Ergebnissen entwickelten TAUCHI ET AL. ein Modell zur M/R/N-Funktion im Hinblick auf die Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen [Tauchi et al., 2002]. Danach könnte die Reparatur in zwei Schritten erfolgen. Im ersten Schritt markiert Nbs1 den Ort der Schädigung, indem es an ein zuvor durch ATM phosphoryliertes Histon in der Nähe des Doppelstrangbruchs bindet. Dies bewirkt die Lokalisation vom frei im Zellkern vorliegenden M/R-Komplex zum Ort der DNA-Läsion. Dieser Prozess kann sogar mikroskopisch durch entsprechende Immunfärbung sichtbar gemacht werden [Nelms et al., 1998]. Im zweiten Schritt könnte der nun assoziierte M/R/N-Komplex direkt an die geschädigte DNA binden und deren Reparatur initiieren. Da der Nachweis einer M/R-unabhängigen Funktion von Nibrin jedoch bisher nicht erbracht werden konnte, bleibt das Modell vorerst eine Hypothese.

Möglicherweise dient M/R/N auch lediglich als molekulares Gerüst, das die DNA-Enden zangenartig zusammenhält, um die Reparatur durch andere Enzyme zu ermöglichen. Letzteres wird durch elektronenmikroskopische- und Röntgenbeugungs-Analysen impliziert [Anderson et al., 2001; de Jager et al., 2001].

Wenn auch in Bezug auf die genaue Funktion des M/R/N-Komplexes noch zahlreiche Unklarheiten bestehen, gilt nach heutigen Erkenntnissen eine Beteiligung von Nbs1 an der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen als gesichert.

1.3.3.3 Funktionen von Nbs1 bei der Zellzykluskontrolle und Apoptose

Im Falle einer DNA-Schädigung muss die Zelle den Zellzyklus vorübergehend stoppen, um nötige Reparaturarbeiten zu ermöglichen. Dieser Mechanismus wird von Genen mit Gatekeeper-Funktion übernommen. Eine Schlüsselrolle in der Reaktion der Zelle auf eine DNA-Schädigung spielt in diesem Zusammenhang das bei AT-Patienten mutierte ATM-Gen. Es besitzt Kinaseaktivität und phosphoryliert nach einer DNA-Schädigung multiple, an der Zellzykluskontrolle beteiligte Proteine [Iliakis et al., 2003]. Infolgedessen sind Zellen von AT-Patienten nach Bestrahlung nicht in der Lage, den Zellzyklus vorübergehend zu stoppen. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das Unvermögen von AT-Zellen, nach Bestrahlung die Replikation in der S-Phase zu stoppen. Dieses Phänomen wird radioresistente DNA-Synthese (RDS) genannt.

Kontroverser als seine Funktionen als Caretaker bei der DNA-Reparatur werden die Aufgaben von Nbs1 als Gatekeeper-Gen bei Prozessen der Zellzykluskontrolle diskutiert. Unumstritten ist dabei eine zumindest partielle Beteiligung von Nbs1 am *intra-*

S-Phase-Checkpoint. Nbs1 wird an mindestens vier Serinresten von ATM phosphoryliert, wobei die Reste 278 und 343 eine wichtige Rolle im S-Phase-Checkpoint spielen [Gatei et al., 2000; Lim et al., 2000; Wu et al., 2000; Zhao et al., 2000]. Dementsprechend sind fast alle untersuchten NBS-Zelllinien ebenso wie AT-Zellen nicht in der Lage, den Zellzyklus nach Bestrahlung kurzfristig zu stoppen – auch hier beobachtet man die radioresistente DNA-Synthese [Sullivan et al., 1997; Taalman et al., 1983].

Die Bedeutung von Nbs1 im *G1/S-Checkpointarrest* ist umstritten. Wiederholt wurde die verzögerte und verminderte p53-Stabilisierung in NBS-Zellen nach Bestrahlung beobachtet [Antoccia et al., 1999; Jongmans et al., 1997; Matsuura et al., 1998]. Dieses wirkt – u. a. durch Induktion von p21 – als Hauptakteur im G1/S-Arrest [el-Deiry et al., 1993]. Dementsprechend konnten einige Arbeitsgruppen einen gestörten G1/S-Checkpoint in NBS-Zellen nachweisen [Antoccia et al., 1999; Jongmans et al., 1997; Sullivan et al., 1997]. In anderen Studien fand sich dagegen ein normaler G1/S-Arrest [Girard et al., 2000; Williams et al., 2002; Yamazaki et al., 1998]. KANG ET AL. zeigten anhand ihres Mausmodells in unbestrahlten MEF-Zellen sogar einen – verglichen mit Kontrollzellen – stärkeren G1/S-Phasenarrest [Kang et al., 2002].

Daten zum *G2/M-Arrest* in NBS-Zellen sind ähnlich widersprüchlich. DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche, müssen repariert werden, bevor die Zellen in die Mitose eintreten. Der G2/M-Arrest stellt hierfür die nötige Zeit zur Verfügung. GIRARD und YAMAZAKI konnten keinen G2/M-Defekt in primären NBS-Fibroblasten nach Bestrahlung finden [Girard et al., 2000; Yamazaki et al., 1998]. Auch XU ET AL., die EBV-transformierte NBS-Lymphozyten untersuchten, fanden einen normalen G2/M-Arrest [Xu et al., 2001]. Andere Autoren fanden wiederum einen gestörten G2/M-Phasenarrest. Dabei wurden sowohl ein verminderter [Buscemi et al., 2001; Demuth et al., 2004; Stiff et al., 2004; Williams et al., 2002] als auch ein verstärkter [Ito et al., 1999; Kang et al., 2002; Williams et al., 2002] Phasenarrest beschrieben. Insgesamt ist eine Erklärung für die divergierenden Ergebnisse vermutlich auch in den unterschiedlichen verwendeten Zelltypen sowie in der Verschiedenheit der NBS-Mutation in humanen und Mauszellen zu suchen.

Trotz der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse scheint Nbs1 eine wichtige Rolle bei der Zellzykluskontrolle zu spielen. So gilt die Fehlsteuerung des Zellzyklus in Form von

radioresistenter DNA-Synthese mittlerweile als eines der Hauptmerkmale des zellulären NBS-Phänotyps.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Nach dem Modell von KINZLER und VOGELSTEIN spielen zwei Klassen von Genen bei der Entartung von Zellen eine besondere Rolle, die Caretaker und die Gatekeeper [Kinzler und Vogelstein, 1997]. Während die Caretaker sich um die Instandhaltung der DNA durch Reparatur kümmern, kontrollieren die Gatekeeper den Zellzyklus und die Apoptose um entartete Zellen zu hemmen bzw. zu eliminieren (vgl. Abb. 1). Mutationen in Genen beider Gruppen können zur Krebsentstehung führen.

Ein erhöhtes Krebsrisiko ist ein Hauptmerkmal des autosomal rezessiv vererbten Nijmegen-Breakage-Syndroms [Seemanova et al., 1985], einem mit weltweit ca. 100 betroffenen Patienten seltenen Chromosomenbruchsyndrom. 1998 konnte die zugrunde liegende Mutation, eine 5bp-Deletion im Nbs1-Gen, identifiziert werden [Varon et al., 1998]. Die Funktionen des durch die Mutation betroffenen Genprodukts, dem Nibrin, sind noch nicht vollständig bekannt. Als unumstritten gilt heute eine Beteiligung des Nibrins als Caretaker bei der DNA-Reparatur. Dabei spielt es eine wichtige Rolle bei der Reparaturform des Non-homologous end joining [Kracker et al., 2005]. Die Funktionen von Nbs1 als Gatekeeper sind hingegen weniger gut erschlossen. Die Kontrolle des Zellzyklus wurde oft untersucht und ergab widersprüchliche Ergebnisse (vgl. Abschnitt 1.3.3.3). Noch unklarer als die Zellzykluskontrolle ist die Rolle von Nbs1 als Gatekeeper bei der Regulation der Apoptose. Zu diesem Themenkomplex liegen zudem bisher kaum Veröffentlichungen vor.

Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von NBS-Zellen hinsichtlich der Fähigkeit, nach einer DNA-Schädigung die Apoptose zu induzieren. Dies war besonders hinsichtlich des klinischen Bildes beim NBS interessant, da Störungen in der Apoptoseregulation mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergehen können [Igney und Krammer, 2002]. Mittels zweier verschiedener Apoptose-Nachweismethoden sollten die Apoptoseraten bei sieben lymphoblastoiden NBS-Zelllinien nach der Behandlung mit dem Radiomimetikum Bleomycin durchflusszytometrisch bestimmt werden. Aufgrund der klinischen und zellulären Überschneidungen im Phänotyp von NBS und Ataxia teleangiectasia (AT) wurden zwei AT-Zelllinien in die Untersuchungen einbezogen.

Zur erfolgreichen Durchführung der Apoptosemessungen war zunächst die Etablierung von Standardbedingungen erforderlich. Die im Rahmen hierzu durchgeführten Experimente zu Zellwachstum und Wachstumsinhibition nach Mutagenexposition dienten gleichzeitig dem Zweck, ein differenzierteres Bild des zellulären NBS-Phänotyps zu gewinnen. Hierbei interessierten – besonders im Hinblick auf die ausgeprägte klinische Variabilität des Krankheitsbildes – evtl. auftretende interindividuelle Unterschiede im zellulären Phänotyp.

2 Material

In diesem Kapitel sind die zur Durchführung der Versuche verwendeten Materialien, Geräte und Computeranwendungen sowie deren Hersteller tabellarisch aufgeführt. Ist bei der Bezugsquelle kein Land aufgeführt, handelt es sich um Orte in Deutschland.

2.1 Zelllinien

Bei sämtlichen verwendeten Zelllinien handelte es sich um Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierte B-Lymphozyten (lymphoblastoide Zellen).

NBS-Zelllinien	Ort der Transformation
JaCe	Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
PeAb	Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
RoZd	Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
94P247	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
94P307	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
95P185	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
96P0048	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin

AT-Zelllinien

AT15	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
L15	Department of Human Genetics, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv/Israel

Kontrollzelllinien

95P466	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
98P651	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
C520	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin

2.2 Zellkulturmedien**Medium**

Fetales Kälberserum
Penicillin/Streptomycin
RPMI

Hersteller

Gibco BRL GmbH,
PAA Laboratories GmbH, Linz,
Österreich
PAA Laboratories GmbH, Linz,
Österreich

2.3 Chemikalien**Substanz**

Agarose
Big Dye Terminator Mix
Bleomycin
Cyclophosphamid
DMSO
dNTPs
Einbettmedium
Ethanol
Ethidiumbromid
Methotrexat
Natriumcitratdihydrat

Hersteller

Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Applied Biosystems GmbH,
Weiterstadt
Mack Medizintechnik GmbH,
Pfaffenhofen
Baxter Oncology GmbH, Frankfurt
Sigma Aldrich Chemie GmbH,
Deisenhofen
Rapidozym, Berlin
Vector Laboratories, Burlingame, CA,
USA
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Medac GmbH, Wedel
Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
PBS-Tabletten	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Rinderserumalbumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt

2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNAse I	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
DNA-Polymerase I	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Proteinase K	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL GmbH, Eggenstein

2.5 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung bzw. Hersteller
Einfriermedium	90% RPMI (15% FKS, Pen/Strep), 10% DMSO
Facs Flow/Safe/Rinse	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Fixierungslösung	25% Essigsäure, 75% Ethanol
Giemsa-Färbelösung	5%ig: 5 ml Giemsa, 10 ml 10xGiemsa- Puffer, 85 ml H ₂ O
Isoton-Lösung (Zellzahlbestimmung)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Ladepuffer A	20% Ficoll 400, 5 mM EDTA, autokl., 0,05% Bromphenolblau
Lysepuffer	1xPCR-Puffer, 1,7 µM SDS, 50 µg/ml Proteinase K
Nicoletti-Puffer	1 M Natriumcitratdihydrat, 0,1% Triton x-100, 50 µg/ml Propidiumiodid

PBS	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄
10xPCR-Puffer I	100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl, 30 mM MgCl ₂ (Mycoplasmentest Minerva)
TBE-Puffer (10x) (Laufpuffer)	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 40 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Triton X-100	Calbiochem, La Jolla, CA, USA

2.6 Geräte

Gerät

ABI Sequencer 3100
Automatische Pipettierhilfe
Brutschrank
Dispensette
FACS Calibur
FACS Scan
Feinwaage BP3100S
Fluoreszenzmikroskop
Geldokumentation
Gelelektrophoresekammer
Invertmikroskop Telaval 31
Mikroliterpipetten
N₂-Tank
Partikelzähler
Schüttelinkubator Thermomixer 5436
Spannungsgeräte (Elektrophorese)
Sterilbank Laminair HBB2448
Thermocycler
Wasserbad
Zentrifugen

Hersteller

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brand GmbH, Wertheim
Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Sartorius AG, Göttingen
Zeiss Axiophot, Oberkochen
Herolab, Wiesloch
Renner GmbH, Dannstadt
Zeiss, Oberkochen
Eppendorf GmbH, Hamburg
Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Eppendorf GmbH, Hamburg
Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Heraeus Holding GmbH, Hanau
Biometra, Göttingen
GFL, Burgwedel
Heraeus, Eppendorf

2.7 Fertige Kits

Kit	Hersteller
Annexin-V Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Dye Ex Spin Kit	Qiagen, Hilden
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Montage PCR (Reinigungskit)	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
Venor GeM®-Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin

2.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Blue-Caps (15/50 ml)	Falcon, Heidelberg
Eppendorfgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen (5 ml)	Falcon, Heidelberg
Gewebezuchtflaschen (50/275 ml)	Falcon, Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Multiwell-Platten (6er/24er)	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PS-Röhrchen (14 ml)	Falcon, Heidelberg
Sterilpipetten (5/10/25 ml)	Falcon, Heidelberg
Transferpipetten, 2,5 ml steril/unsteril	Sarstedt, Nümbrecht

2.9 Computeranwendungen

Anwendung	Hersteller
CellQuest Software, V. 4.0.2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
WinMdi, V. 2.8	J. Trotter, La Jolla, CA, USA
Sigma Plot, V. 8.0	SPSS Science, Chicago, IL, USA
Microsoft Excel 97	Microsoft Corp., Seattle, WA, USA

Als DNA-Längenvergleichsstandard wurde der Marker pSP65/Hinf I (AG Digweed) eingesetzt. Für molekularbiologische Arbeiten wurde deionisiertes Wasser aus einer

Aufbereitungsanlage (MilliQ UFplus) der Firma Millipore Corp. (Bedford, MA, USA), mit einer Leitfähigkeit von 5 –15 mΩ/cm verwendet.

3 Methoden

Dieses Kapitel stellt die zur Durchführung der Experimente verwendeten Methoden dar. Die Abschnitte 3.1 bis 3.6 befassen sich mit allgemeinen Methoden wie der Kultivierung der Zelllinien, der Bestimmung der Zellzahl und der Chromosomenanalyse. Hier werden auch die Methoden der PCR und der DNA-Sequenzierung vorgestellt, die vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihen zur Unterscheidung der Zelllinien, zur Testung auf Mycoplasmen und zum Nachweis der 657del5-Mutation in den NBS-Zelllinien verwendet wurden.

Die Abschnitte 3.7 bis 3.9 stellen die Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zur Wachstumsinhibition der NBS-Zelllinien dar. Die Wachstumsinhibition wurde mit drei verschiedenen Mutagenen untersucht, die kurz charakterisiert werden.

In den Abschnitten 3.10 und 3.11 folgt die Beschreibung der Versuche zur Apoptoseinduktion in lymphoblastoiden NBS-Zelllinien. Die verwendeten Apoptose-nachweisverfahren – die sub-G1-peak-Methode und die Annexin-V-Färbung – werden vorgestellt. Darüber hinaus werden kurz die Grundlagen der durchflusszytometrischen Technik beschrieben, die zur Messung der Apoptoseraten verwendet wurde.

3.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank (-196°C) auf Eis transportiert und in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die in Einfriermedium gelösten Zellen wurden mit einer Transferpipette in 9 ml RPMI (15% FKS/Pen/Strep) überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert, in eine kleine Gewebezuchtflasche (50 ml) überführt und in den Brutschrank gestellt.

Die Zellen wurden in Gewebezuchtflaschen (275 ml) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das verwendete Zellkulturmedium (RPMI) wurde mit 15% fetalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) versetzt und bei 4°C verwahrt. Im Durchschnitt wurden die Zellen alle 3-4 Tage im Verhältnis von 1:2, 1:4 oder 1:9, je nach Teilungsrate, in eine neue Flasche überführt. Das Umsetzen erfolgte unter sterilen Bedingungen in folgenden Schritten:

- Vereinzelung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren mit einer sterilen 10 ml Pipette
- Überführen des entsprechenden Anteils Zellsuspension in eine neue Flasche
- Auffüllen bis auf 50 ml mit frischem Medium

Sollten Zellen über einen längeren Zeitraum konserviert werden, wurden sie nach folgendem Protokoll eingefroren:

- Die durch Auf- und Abpipettieren vereinzelter Zellen wurden aus der mittleren Gewebezuchtflasche in ein 50 ml Blue-Cap-Röhrchen überführt und bei 100 rpm für 10 min zentrifugiert.
- Das sichtbare Zellpellet wurde mit einer sterilen Transferpipette in 2-3 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) verhinderte die Kristallbildung innerhalb der Zellen sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas.
- Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein verschließbares Kryoröhrchen gegeben und sofort auf Eis gestellt.
- Um ein schrittweises Abkühlen zu gewährleisten, wurden die Zellen für mindestens 24 h in einer Einfrierbox aus Styropor bei -80°C aufbewahrt.

Über den Zeitraum von einigen Monaten konnten die Zellen bei -80°C verwahrt werden; bei längerer Verwahrung wurden sie in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde automatisch mit Hilfe eines Partikelzählers der Firma Beckman Coulter bestimmt. Das Prinzip der Zählung und Größenbestimmung beruht auf der Messung der Widerstandsänderung, die eine Zelle auslöst, wenn sie in einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit suspendiert wird und durch eine kleine Kapillaröffnung tritt. Die zu messende Partikelgröße wurde auf 7,7-13,4 µm Durchmesser, die durchschnittliche Lymphozytengröße, eingestellt. Da tote Zellen einer Schrumpfung unterliegen, ist ihr Durchmesser kleiner als der lebender Zellen, so dass nur vitale Zellen gezählt werden.

Für die Zellzahlbestimmung mussten die Zellen zunächst vereinzelt werden. 200 µl der Zellsuspension wurden in ein Zählgefäß mit 10 ml isotoner Lösung gegeben, unter die

Kapillare in den Partikelzähler gestellt und gemessen. Das Gerät zählt jeweils zweimal 500 μl und mittelt das Ergebnis. Auf einem Display wurden die Zellzahl und die Größenverteilung der Zellen abgelesen. Das Ergebnis wurde mit dem Faktor 100 multipliziert.

3.3 Chromosomenanalyse

Um grobe Aberrationen wie z. B. eine Tetraploidie der verwendeten Zelllinien auszuschließen, wurden die Zellen vor Beginn der Versuche einer Chromosomenanalyse unterzogen.

Für die Analyse wurden 1×10^6 Zellen entnommen, 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in 3 ml frischem Medium aufgenommen. Die Suspension wurde in 50 ml Gewebezuchtflaschen überführt und zwei Tage im Brutschrank verwahrt.

Zur *Fixierung* wurden Die Zellen eine Stunde in 30 μl Colcemid inkubiert und anschließend in Röhrchen überführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml 0,4% KCl resuspendiert und 10 min inkubiert. Die hypotone Lösung bewirkt ein Aufquellen der Zellen. Währenddessen wurden 100 ml Fixierungslösung bestehend aus 25 ml Essigsäure und 75 ml Ethanol angesetzt. Der Überstand wurde bis auf etwa 500 μl abgenommen und die Zellen resuspendiert.

Da die erste Fixierung langsam erfolgen muss, wurden mehrere Tropfen Fixativ langsam nacheinander zugegeben. Anschließend wurden die Röhrchen geschüttelt und weitere 5 ml Fixativ zugegeben. Wieder wurde 10 min/1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden zwei weitere Male in 5 ml Fixativ fixiert, resuspendiert und 10 min/1000 rpm zentrifugiert.

Je zwei Tropfen der Zellsuspension wurden auf gekühlte, beschriftete Objektträger aufgetropft und unter einer 65-Watt-Lampe getrocknet.

Für die *Färbung* wurden die Objektträger für 8 min in Giemsa-Lösung getaucht und mit Wasser abgespült. Die Präparate wurden auf einer Wärmebank bei 42°C getrocknet, etwas Einbettmedium aufgebracht und ein Deckglas aufgedrückt. Für die Auswertung wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop auf grobe Veränderungen im Chromosomensatz untersucht. Pro Zelllinie wurden 20 Metaphasen beurteilt. Bei mehr als einer tetraploiden Metaphase wurde die Zelllinie von den Apoptoseversuchen

ausgeschlossen. Pro Präparat wurden zwei digitale Fotos von Metaphasen gemacht und abgespeichert.

3.4 DNA-Extraktion aus lymphoblastoiden Zellen

Nach sorgfältiger Resuspension wurde 1 ml Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Zunächst erfolgte die Zentrifugation für 2 min bei 2000 rpm, anschließend für 30 sec bei 14 000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 30 µl Lysepuffer resuspendiert, 1 h bei 37°C und nochmals für 10 min bei 85°C inkubiert. Die anschließende Zentrifugation von 10 min bei 14 000 rpm bewirkte die Sedimentation von Zelltrümmern am Boden des Gefäßes während die DNA im Überstand gelöst war. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 1,5 µl des Überstandes wurden für die nachfolgend beschriebenen PCR-Reaktionen verwendet.

3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der Nukleotidsequenzen, die den gewünschten Genabschnitt flankieren. Zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die komplementär zu den flankierenden Sequenzen sind, binden an die durch Erhitzen denaturierte, einzelsträngig vorliegende DNA und dienen als Startpunkt für die DNA-Synthese. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer entlang der einzelsträngigen Matrize und synthetisiert so den komplementären DNA-Strang. Durch ein in der Regel dreistufiges Temperaturprofil werden die Einzelschritte der Reaktion – Denaturierung des Doppelstrangs, Anlagerung der Primer und Synthetisieren der komplementären DNA – koordiniert. Durch 20-35fache Wiederholung dieses Zyklus lässt sich eine nahezu exponentielle Anreicherung der Zielsequenz erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Abgrenzung der verwendeten Zelllinien gegeneinander zu Beginn und Ende der Experimente genutzt. Kontaminationen der Zelllinien untereinander sollten dadurch ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden alle Linien mittels PCR auf Mycoplasmen getestet. Außerdem wurden PCR-Produkte der sieben verwendeten NBS-Zelllinien zum Nachweis der 657del5 Mutation sequenziert.

3.5.1 Nachweis der Zellgleichheit

Vor Beginn und nach Abschluss der Versuche wurden die verwendeten Zelllinien molekulargenetisch auf Zellgleichheit untersucht. Zu diesem Zweck kam der so genannte Minisatellitentest zum Einsatz. Minisatelliten-DNA besteht aus Kopien von DNA-Abschnitten (*Repeats*) von 16-64 Basenpaaren, die sich über das gesamte Genom verteilt finden. Überwiegend werden sie weder transkribiert, noch kann ihnen eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden. Man bezeichnet diese polymorphen Sequenzen auch als VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Da die Anzahl dieser repetitiven Sequenzeinheiten von Mensch zu Mensch variiert, ist es möglich, durch die Bestimmung der Anzahl an Repeats Individuen gegeneinander abzugrenzen.

Der hier verwendete Minisatellit D1S80 besteht aus einer Einheit von 16 Basenpaaren, die im menschlichen Erbgut zwischen 13 und 37mal kopiert vorliegen kann. Mittels PCR läßt sich die genaue Anzahl der Sequenzeinheiten bestimmen.

Für den Versuch wurde humane genomische DNA aus den Zelllinien extrahiert (vgl. Abschnitt 3.4). Ein PCR-Ansatz mit 25 µl Endvolumen enthielt 2 µl genomische DNA und 0,2 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl). Die Konzentration der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) betrug 0,8 mM, die der Primer jeweils 0,15 µM. Durch Zusatz von $\frac{1}{10}$ Volumen 10xPCR-Puffer wurde die Konzentration der zusätzlichen Komponenten eingestellt.

PCR-Profil:

5 min	94°C	32 Zyklen
30 sec	94°C	
30 sec	65°C	
1 min	72°C	
10 min	72°C	

3.5.2 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Der pH-Wert des TBE-Puffers lag mit 8,3 im basischen Bereich, in dem Protonen von der DNA abdiffundieren und diese somit negativ geladen vorliegt. Durch

Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich die DNA zur positiv geladenen Anode. Abhängig von der Größe der PCR-Produkte wandert die DNA unterschiedlich schnell durch das Agarosegel. Dadurch kommt es zur Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die kleinsten Fragmente am schnellsten wandern.

Zur Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten 1,5%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose auf 100 ml mit TE-Puffer aufgefüllt, in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und gelöst. Zur Detektion der DNA wurden 0,05 µg/ml des Farbstoffes Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht. Die Agaroselösung wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach Erkalten und Verfestigung des Gels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel mit TBE-Puffer überschichtet.

Die DNA wurde in Ladepuffer aufgenommen (0,3 Vol.) und in die Geltaschen gegeben. Als DNA-Längenvergleichsstandard dienten selbst hergestellte Marker der entsprechenden Repeatzahl, die zusammen mit den PCR-Produkten aufgetragen wurden. Anhand ihrer Größe ließ sich die jeweilige Größe der Produkte in Basenpaaren schätzen.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 120 V für 30 min. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und das Bild digital gespeichert.

3.5.3 *Mycoplasmentest*

Vor Beginn der Experimente wurden alle Zelllinien auf Mycoplasmen getestet. Mycoplasmen sind zellwandlose Bakterien mit einem besonders kleinen Genom. Für die Zellkultur stellen sie eine besondere Gefahr dar, da sie nur schwer nachweisbar sind, den Zellstoffwechsel jedoch nachhaltig beeinflussen können. So können sie z. B. das Zellwachstum hemmen und zu chromosomaler Instabilität führen.

Die Zellen wurden resuspendiert und je 200 µl des Zellsuspensionsüberstandes in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert, um evtl. enthaltene Mycoplasmen zu lysieren und DNAsen zu inaktivieren. Durch anschließende Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm wurden störende Zelltrümmer abgetrennt. Für die PCR-Reaktion wurden 0,5 µl des Überstandes verwendet. Eine

Null-Kontrolle (steriles, deionisiertes Wasser) und eine Mycoplasmen-Positivkontrolle (*Mycoplasma orale* DNA, Minerva Biolabs) wurden mitgeführt.

Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 10 µl. Er enthielt 1 µl 10xPCR Reaktionspuffer (Minerva), 1 µl Primer/Nukleotide (Minerva) und 0,04 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl). Mit ddH₂O wurde auf ein Volumen von 9,5 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 0,5 µl DNA wurde die PCR nach folgendem Profil durchgeführt.

2 min	94°C	34 Zyklen
2 min	55°C	
2 min	72°C	
30 sec	94°C	
1 min	55°C	
1 min	72°C	

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben im 1,5%igen Agarosegel bei einer Spannung von 120 V für ca. 30 min.

3.6 Mutationsnachweis durch Sequenzierung

Vor Beginn der Versuche wurden alle verwendeten NBS-Zelllinien auf die Mutation 657del5 getestet, um sicher zu gehen, dass die Linien tatsächlich Träger der Mutation sind. Hierfür wurde das von SANGER ET AL. beschriebene Verfahren der Sequenzierung durch kontrollierten Kettenabbruch verwendet [Sanger et al., 1977]. In Abhängigkeit von Primer und Matrizenstrang wird von einer DNA-Polymerase ein farbiges DNA-Produkt synthetisiert. Die Markierung erfolgt mit in vier verschiedenen Farben fluoreszierenden ddNTPs. Jeder Base ist ein spezifisches Fluorophor zugeordnet. Bei der Gelelektrophorese misst ein Detektor die Fluoreszenzsignale der vorbeiwandernden DNA und zeichnet sie auf. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt in Form von Intensitätsprofilen, aus denen die exakte Basensequenz abgelesen werden kann (vgl. Abb. 9).

3.6.1 Reinigung der PCR-Produkte

Die PCR wurde unter den in 3.5 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Für jede Zelllinie wurde ein PCR-Produkt von Exon 6 des Nbs1-Gens mit Hilfe der Primer NBS Ex6-F und -R (biomers.net GmbH, Ulm) gewonnen. Nach der Agarosegelkontrolle

wurden die Produkte von restlichen Primern, dNTPs, Salzen etc. gereinigt. Dies erfolgte mit Hilfe eines Kits der Firma Millipore. Das Kit besteht aus Eppendorf-ähnlichen Probengefäßen und kleinen Säulen mit Filter.

Zunächst wurde für jede Probe eine Filtersäule in ein Probengefäß gesteckt. Die PCR-Produkte wurden in 4 µl ddH₂O gelöst, mit sterilem Wasser auf 500 µl aufgefüllt und auf die Filtersäulen aufgetragen. Die Säulen wurden 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die DNA-haltige Filtersäule auf ein sauberes Probengefäß gesteckt. Für die Elution der DNA wurden 30 µl H₂O zugegeben und erneut zentrifugiert (2 min/4000 rpm).

3.6.2 *Ansatz der Sequenzierreaktion*

Die Sequenzierreaktion wurde nach folgendem Ansatz auf Eis pipettiert:

5 µl PCR-Produkt
2 µl Big Dye Terminator Mix
2 µl 1,6 µl/mol Primer
7 µl steriles H₂O
4 µl Puffer

PCR-Profil zur Sequenzierung:

10 sec	96°C	25 Zyklen
5 sec	50°C	
4min	60°C	

Das Sequenzierprodukt wurde von nicht eingebauten Nukleotiden mit dem Dye-Ex Spin Kit gereinigt. Dieses Kit besteht aus kleinen Säulen mit einer Gelmatrix (Sephadex) und entsprechenden 2 ml Probengefäßen zum Auffangen der eluierten DNA. Zunächst wurden die Deckel der Säulen geöffnet und die Säulen kurz gemischt, um das Sephadex vollständig zu resuspendieren. Dann wurde der Säulenverschluss am Boden entfernt und die Säule in ein Eppendorfgefäß gesetzt. Die Säulen mit Eppendorfgefäß wurden 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert und in saubere Eppendorfgefäße gesetzt. Anschließend wurde das gesamte Volumen der Sequenzierreaktion auf die Membran aufgetragen. Es folgte eine weitere Zentrifugation von 3 min bei 3000 rpm, um die DNA

von der Säule in das Eppendorfgefäß zu eluieren. Zuletzt wurden 10 µl steriles Wasser zugegeben.

Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion erfolgte im DNA-Sequenzierer ABI 3100. Dabei wurden die DNA-Fragmente in einem Gel der Größe nach getrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe mittels Laser angeregt und gemessen. Die erhaltene Sequenz konnte in Form eines vierfarbigen Ausdrucks dokumentiert werden, wobei jede Farbe für eine der vier Basen steht (vgl. Abb. 9).

3.7 Wachstumsexperimente

Das Wachstum kultivierter Zellen teilt sich, wie das der Bakterien, in drei Phasen. Nach der Lag-Phase, in der sich der Stoffwechsel an die Bedingungen des Nährmediums anpasst und die Zellzahl noch nicht zunimmt, folgt die exponentielle Wachstumsphase. Im Anschluss erfolgt eine Verlangsamung des Wachstums und der Übergang in die stationäre Phase durch Erschöpfung der Nährstoffe und Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte. Schließlich sterben die Zellen ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum lymphoblastoider NBS-Zelllinien untersucht. Zum einen interessierten die Wachstumseigenschaften der Zelllinien, zum anderen mussten zur Etablierung der Standardbedingungen für die Apoptoseversuche die Wachstumsraten aus folgendem Grund bekannt sein.

Für Apoptosemessungen ist wichtig, dass der prozentuale Anteil an spontaner Apoptose, der so genannten Hintergrundapoptose, so gering wie möglich ausfällt. Nur dadurch wird es möglich, die gemessene Apoptoserate auch tatsächlich auf die durchgeführte Behandlung der Zellen zurückzuführen. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Zellen sich zum Zeitpunkt der Messung in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und nicht etwa unter Nährstoffmangel leiden, welcher ebenfalls Apoptose auslösen kann. Dies würde den prozentualen Anteil der Hintergrundapoptose erhöhen, was wiederum zu Verfälschungen der Messergebnisse führen kann. Ziel war es, eine Hintergrundapoptose von unter 10% zu erreichen. In den hier durchgeführten Versuchen lag sie bei der sub-G₁-peak-Methode im Mittel bei 7,7%, bei der Annexinfärbung bei 6,2% (s. u.).

Um herauszufinden, welche Zelldichte sich für die Versuche eignet, wurden Zellen in ansteigender Dichte in Platten mit 6 bzw. 24 Vertiefungen pipettiert, und ihr Wachstum

über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen verfolgt. Die Zählung der Zellen erfolgte täglich mit dem Coulter-Counter. Für jeden Zähltag wurde eine Vertiefung angesetzt, um Verfälschungen der Ergebnisse durch die stetige Abnahme des Volumens zu vermeiden.

Um auch nach der Mutagenbehandlung noch genügend Zellen für die Auswertung am Durchflusszytometer übrig zu haben, wurde zunächst eine relativ hohe Ausgangszellzahl von 5×10^5 Zellen/ml verwendet. Später erfolgte eine Verringerung auf 3×10^5 Zellen/ml, da bei dieser Zellzahl sowohl ein exponentielles Wachstum der Kulturen bis zum Tag 4 nach Versuchsbeginn als auch eine ausreichende Zellzahl zur FACS-Messung gewährleistet waren (s. u.).

3.8 Mutagene

In den Experimenten zur Wachstumsinhibition (s. u.) wurden die Mutagene Bleomycin, Methotrexat und Cyclophosphamid eingesetzt. Für den Großteil der Versuche zur Apoptoseinduktion wurde Bleomycin verwendet. Alle Mutagene wurden bei -20°C gelagert und vor jedem Versuch frisch aufgetaut.

3.8.1 Bleomycin

Bleomycin ist ein in der Klinik als Zytostatikum eingesetztes Antibiotikum, das aus dem Pilz *Streptomyces verticillus* isoliert wird. Es wird vorwiegend zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen verwendet.

Bleomycin ist ein Glykopeptidgemisch, das wie eine Nukleosidase wirkt und Thymin aus der DNA abspaltet. Dadurch induziert Bleomycin an isolierter DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche. Aufgrund der Ähnlichkeit des Schadensspektrums zu dem ionisierender Strahlung wird Bleomycin auch als Radiomimetikum bezeichnet. Die Mechanismen der zytostatischen Wirksamkeit des Bleomycins sind nicht vollständig bekannt. VERNOLE ET AL. konnten eine Apoptoseinduktion in Lymphozyten durch Bleomycin nachweisen [Vernole et al., 1998].

Das für die Experimente verwendete, wasserlösliche Bleomycin wird von der Firma Mack unter dem Namen *Bleomycinum* vertrieben. Eine Flasche enthält 7-10 mg lyophilisiertes Bleomycinsulfat, entsprechend einer standardisierten biologischen Aktivität von 15 000 U Bleomycin.

Für die Experimente wurde das Bleomycin in 15 ml sterilfiltriertem Wasser gelöst, in Aliquots von 500 µl à 1 µg/µl abgefüllt und bei -20°C verwahrt.

3.8.2 *Cyclophosphamid*

Cyclophosphamid gehört zur Gruppe der bifunktionell-alkylierenden Zytostatika. Als Immunsuppressivum wird es bei schwer verlaufenden Autoimmunerkrankungen und nach Organ- und Knochenmarkstransplantationen angewandt. Weiterhin wird es zur Chemotherapie maligner Tumoren verwendet.

Die zytotoxische Wirkung des Cyclophosphamids wird durch eine kovalente Quervernetzung der DNA-Einzelstränge verursacht, wodurch die Replikation und Transkription aller sich teilenden Zellen gehemmt wird. Dies führt zu Funktionsverlust und Zelltod. Cyclophosphamid kann in jede Phase des Zellzyklus eingreifen [Mazur et al., 2002], wobei sich der zytotoxische Effekt besonders während der DNA-Synthesephase bemerkbar macht.

Das in den Experimenten verwendete Cyclophosphamid wird von der Firma Baxter Oncology unter dem Namen *Endoxan* vertrieben. Eine Flasche enthält 1g Trockensubstanz, die in 50 ml sterilfiltriertem Wasser gelöst wurde (71,66 mM).

3.8.3 *Methotrexat*

Methotrexat gehört wie das Cyclophosphamid zu den zytotoxischen Immunsuppressiva, die neben der Immunsuppression auch zur Chemotherapie verwendet werden. Als Antimetabolit der Folsäure hemmt Methotrexat die Dihydrofolatreduktase. In der Folge wird vermindert Tetrahydrofolsäure gebildet, die zur Übertragung von Methylgruppen notwendig ist. Dadurch vermindert sich die Bildung von Thymidin und Purinbasen; die so gestörte DNA- und RNA-Synthese führt zu Funktionsverlust und Zelltod. Dies erklärt, warum Methotrexat seine Wirkung hauptsächlich in der DNA-Synthesephase entfaltet.

Methotrexat wird von der Firma Medac unter dem Namen *Methotrexat* in Injektionsflaschen mit je 15 mg Methotrexat vertrieben.

3.9 Wachstumsinhibitions-Experimente

In Wachstumsinhibitionsexperimenten wurde die Sensitivität lymphoblastoider NBS-Zellen gegenüber den Zytostatika Bleomycin, Cyclophosphamid und Methotrexat (s. o.) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des

entsprechenden Mutagens behandelt. $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden in 1 ml RPMI gelöst, in 24er Mikrotiterplatten ausplattiert und das Mutagen in ansteigenden Konzentrationen zugegeben (0,5 ml, dreifach konzentriert, Endvolumen 1,5 ml). Für jede Mutagenkonzentration wurden Doppelwerte (zwei Vertiefungen) angesetzt. Fünf Tage nach Beginn der Behandlung wurden die lebenden Zellen mit der Coulter-Methode gezählt. Zur Beurteilung der Sensitivität gegenüber dem Mutagen wurde die LD₅₀ (letale Dosis) ermittelt, also die Konzentration, bei der 50% der Zellen abgestorben sind.

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Sigma Plot 8.0 (SPSS Science) anhand von Wachstumskurven graphisch dargestellt (vgl. Abb. 12).

3.10 Induktion der Apoptose in NBS-Zellen

In den Apoptoseversuchen wurde die Apoptoseinduktion in lymphoblastoiden NBS-Zellen durch Bleomycin untersucht. Hierzu wurden die Zellen in 6er-Multiwell-Platten gegeben und mit den entsprechenden Bleomycinkonzentrationen versetzt. Zum Apoptosenachweis wurden zwei verschiedene Methoden – die sub-G₁-peak-Methode und die Annexin-V-Färbung (s. u.) – verwendet. Nach der Apoptosefärbung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Die ebenfalls verwendete TUNEL-Methode, die auf der Fluoreszenz-Markierung freier 3'-OH-DNA-Enden durch eine terminale Transferase basiert, konnte keine auswertbaren Ergebnisse liefern. Schwierigkeiten bei der Permeabilisierung der Zellen hatten zur unzureichenden Farbstoffaufnahme der Zellen und nachfolgend zur verminderten Anfärbung der Strangbrüche geführt. Dadurch konnten apoptotische Zellen durchflusszytometrisch von vitalen Zellen nicht eindeutig abgegrenzt werden.

3.10.1 Bleomycinbehandlung

Um die gewünschte Anzahl Zellen zu entnehmen, musste zunächst die Zellzahl in den Kulturflaschen mit der Coulter-Methode bestimmt werden. Für die nachfolgenden Messungen der Apoptoseraten war es wichtig, dass sich die Zellen bereits zum Entnahmezeitpunkt im exponentiellen Wachstum befanden. Es zeigte sich, dass die besten Ergebnisse mit der niedrigsten Hintergrundapoptose erzielt werden konnten, wenn die Zellen drei Tage vor Entnahme auf eine Dichte von ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml gesplittet wurden. So betrug die Zellzahl zu Versuchsbeginn regelmäßig etwa $3-4 \times 10^5$ Zellen/ml.

Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen an Zellsuspension wurde aus der Kulturflasche entnommen, in 50 ml Blue-Caps überführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Es wurde entsprechend so viel Medium zugegeben, dass die Zelldichte bei $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml lag. Pro Vertiefung wurden nun 1×10^6 Zellen, resuspendiert in 2,5 ml Medium, ausplattiert. Für jede Zelllinie wurden pro Bleomycinkonzentration jeweils drei Vertiefungen mit Zellen angesetzt.

Die Bleomycinverdünnungen wurden direkt vor Versuchsbeginn hergestellt. Dabei wurde der Wirkstoff so weit verdünnt, dass die pro Vertiefung gewünschte Konzentration in 0,5 ml Verdünnung vorlag. So konnte zu den bereits vorgelegten 2,5 ml die entsprechende Bleomycinkonzentration in 0,5 ml zugegeben werden, um ein Endvolumen von 3 ml pro Vertiefung zu erzielen. Nach Zugabe des Bleomycins wurden die Platten in den Brutschrank gestellt und, je nach Versuchsaufbau, 1-5 Tage darauf zur Apoptosemessung weiterverarbeitet.

3.10.2 Apoptosenachweis mit der sub-G₁-peak-Methode

Ein typisches Apoptosemerkmal ist die Spaltung der DNA durch Endonukleasen in charakteristische, ca. 180 bp-große DNA-Fragmente [Wyllie, 1980]. In apoptotischen Zellen ist daher – verglichen mit vitalen Zellen – der Gehalt an niedermolekularer DNA erhöht, der Anteil hochmolekularer DNA dagegen reduziert. Induziert man nun eine Lyse der Zellmembran, kommt es zum Austreten und nachfolgendem Verlust der niedermolekularen DNA-Fragmente in apoptotischen Zellen, während intakte, hochmolekulare DNA im Zellkern verbleibt. Auf dem Nachweis des somit niedrigeren DNA-Gehalts apoptotischer Zellen beruht die 1991 von NICOLETTI ET AL. (daher auch NICOLETTI-Methode genannt) entwickelte sub-G₁-peak-Methode [Nicoletti et al., 1991]. Hierbei wird der zelluläre DNA-Gehalt nach Permeabilisierung der Zellmembran und Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei erscheinen apoptotische Zellkerne als breiter, hypodiploider, schwächer-fluoreszierender DNA-Peak (sub-G₁-Peak), der leicht vom schmalen DNA-Doppelpeak gesunder Zellen mit diploidem DNA-Gehalt unterschieden werden kann (vgl. Abb. 17).

Für die Durchführung der sub-G₁-peak-Methode wurden 2×10^5 bleomycinbehandelte Zellen in Eppendorfgefäße überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 200 µl eines hypotonen Propidiumiodid-Puffers (NICOLETTI-Puffer) ohne

zu resuspendieren zugegeben. Die Inkubation der Zellen im hypotonen Puffer führte zum Platzen der Zellmembranen. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C im Dunkeln konnten die Proben am Durchflusszytometer gemessen werden (s. u.).

Bei der Einstellung des FACS-Gerätes (vgl. Abschnitt 3.11) wurden die Kanäle Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht, FSC) und Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht, SSC) im linearen Modus, der FL-3 Kanal für die Messung der Propidiumiodid-Fluoreszenz im logarithmischen Modus gemessen. Da bei dieser Methode nur die Fluoreszenz der Zellkerne gemessen wird, musste vor der Messung ein Gate gesetzt werden, um den durch die Lyse entstandenen Zellschutt von der Messung auszuschließen.

Die Auswertung der Messungen erfolgte an einem MacOS 9.2-Computer (Apple Computer Inc., München) mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences). Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde durch Setzen des Markers M1 über den hypodiploiden DNA-peak bestimmt (vgl. Abb. 17).

3.10.3 Apoptosenachweis mittels Annexin-V-Färbung

Die Annexin-V-Färbung ist eine etablierte und vielfach dokumentierte Methode zum Apoptosenachweis, die erstmals 1995 von VERMES ET AL. beschrieben wurde [Vermes et al., 1995]. Sie beruht auf charakteristischen Veränderungen der Plasmamembran im Verlauf des Apoptoseprozesses.

Während der Apoptose verliert die Plasmamembran ihre asymmetrische Struktur. Phosphatidylserine, die normalerweise nur auf der Membraninnenseite vorkommen, translozieren auf die Außenseite der Membran. Dies geschieht schon in einer sehr frühen Phase der Apoptose [van Engeland et al., 1998]. Das 35kDa-Protein Annexin-V besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen (PS) und bindet kalziumabhängig an PS-exponierende Zellen. Durch Fluoreszenzmarkierung des Annexins mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat, grüne Fluoreszenz) wird es nun möglich, apoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie zu erfassen und von nicht-fluoreszierenden, vitalen Zellen abzugrenzen (s. u.).

Die Translokation der Phosphatidylserine auf die Membranaußenseite tritt allerdings nicht ausschließlich während der Apoptose auf, sondern auch bei der Nekrose. Im Unterschied zur apoptotischen verlieren nekrotische Zellen jedoch die Integrität der Zellmembran. Färbt man die Zellen nun zusätzlich mit Propidiumiodid (PI, 350 nm),

einem DNA-Farbstoff, gelangt dieser nur in durchlässige, nekrotische, nicht aber in apoptotische Zellen. Das Durchflusszytometer ist so in der Lage, apoptotische (FITC+/PI-) von lebenden (FITC-/PI-) und nekrotischen (FITC+/PI+) Zellen zu trennen (vgl. Abb. 19).

Die für die Apoptosemessungen vorgesehenen Zellen wurden, je nach Versuchsaufbau, 1-5 Tage nach der Bleomycinbehandlung geerntet und in 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Bestimmung der spontanen Apoptoserate (Hintergrundapoptose) der Zelllinien wurden unbehandelte Zellen bei jedem Versuch mitgeführt (vgl. Abschnitt 3.7). Zunächst wurde der Überstand 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, abgesaugt und die Zellen in 7 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Für die Färbung wurden die Zellen in 100 µl 1x Bindungspuffer (im Annexin-Kit 10x konzentriert enthalten) aufgenommen und in 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 µl Annexin-V/FITC und 8 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) gefärbt und 30-60 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Bindungspuffer konnten die Proben am Durchflusszytometer gemessen werden. 10 000 Zellen wurden analysiert und ihre Fluoreszenz im Dot-Plot-Diagramm dargestellt. Ein Beispiel findet sich in Abb. 19. Die X-Achse erfasst die Fluoreszenz von FITC-markiertem Annexin-V im FL-1-Kanal, die Y-Achse die PI-Fluoreszenz im FL-3-Kanal.

Die Auswertung der Messungen erfolgte ebenfalls mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences). Der Dot-Plot wurde in vier Quadranten unterteilt und den einzelnen Zellfraktionen (vitale, apoptotische und spätapoptotische/nekrotische Zellen) zugeteilt.

3.11 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle und effiziente Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften. Sie erlaubt für mehrere Tausend Einzelzellen innerhalb weniger Sekunden die gleichzeitige Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie bis zu drei verschiedener Fluoreszenzfarben.

3.11.1 Aufbau und Funktionsweise des Durchflusszytometers

Voraussetzung für die durchflusszytometrische Messung ist das Vorliegen der Zellen in Einzelzellsuspension. Die Probenflüssigkeit wird unter Druck durch eine Kapillare gepreßt. Dabei wird sie durch eine Mantelflüssigkeit beschleunigt, die unter etwas

geringerem Druck steht. Dies führt zu einer laminären Strömung, in der die Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung einzeln nacheinander einen Messpunkt passieren. Auf den Messpunkt ist ein Laserstrahl (Argonlaser, 488 nm) fokussiert. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften der Zellen kommt es zur charakteristischen Streuung und Absorption des Lichts. Das absorbierte Vorwärtsstreulicht spiegelt hierbei die Zellgröße, das nach 90° seitwärts gestreute Licht die Granularität ungefärbter Zellen wider. Hierdurch lassen sich z. B. lebende Zellen (groß, weniger granulär) von toten (klein, granulär) trennen. Fluoreszenzen werden, wie das Seitwärtsstreulicht, in 90°-Richtung aufgenommen. Bei fluoreszierenden Zellen absorbieren die Fluorochrome (Fluoreszein, Propidiumiodid) zunächst Licht einer Wellenlänge von 488 nm, welches sie dann langwelliger wieder emittieren. Mit Hilfe eines Filtersystems können die Fluoreszenzfarben unterschieden werden (grün, rot, orange). Das gestreute und emittierte Licht wird durch Photodetektoren aufgenommen, und die digitalisierten Signale durch einen Computer weiterverarbeitet und quantitativ ausgewertet.

Für die Auswertung werden die unterschiedlichen Amplituden der Lichtsignale Kanälen zugeordnet. Alle gemessenen Amplituden beschreiben die jeweilige Zelle. In Histogrammen und Dot-Plots können die Messwerte dargestellt und ausgewertet werden (vgl. Abb. 17 und Abb. 19).

3.11.2 Probenmessung und Datenauswertung

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erfolgten die Messungen mit einem Durchflusszytometer vom Typ FACS Scan der Firma Becton Dickinson. Zwischenzeitlich musste aufgrund eines Laserdefekts auf ein Gerät vom Typ FACS Calibur der Firma Becton Dickinson ausgewichen werden, wobei alle gespeicherten Einstellungen übernommen werden konnten. Die Geräte wurden in regelmäßigen Abständen durch die Firma Becton Dickinson mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Mikropartikel (Mikrobeads) gewartet. Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurden linear, die Fluoreszenzen logarithmisch erfasst.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale werden nicht nur in dem für ihre Erfassung vorgesehenen Kanal registriert, sondern strahlen auch in andere Kanäle aus, was zu Messfehlern führen kann. Deshalb wird ein Anteil des Fluoreszenzsignals in den Kanälen proportional zur Fluoreszenzintensität im eigentlich vorgesehenen Kanal

subtrahiert. Dieser Vorgang (Kompensation) wurde bei der Wartung des Geräts regelmäßig mit einfach gefärbten Zellen oder Mikrobeads durchgeführt.

Pro Probe wurden 10 000 Zellen bei einer Messrate von ca. 1000-2000 Zellen/sec. gemessen (je nach Zelldichte). Die Fluorochrome wurden mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt. Die FITC-Fluoreszenz (grün, Emissionsspektrum 515-545 nm) wurde im Kanal 1 (FL1) registriert. Propidiumiodid (rot, Emissionsspektrum 575-620 nm) wurde in Kanal 3 (FL3) gemessen.

Vor Beginn der Messungen am Zytometer mussten die einzelnen Kanalverstärkungen für jede Zelllinie spezifisch eingestellt werden. Hierbei war es wichtig, die Zellen sowohl im FSC/SSC als auch im Fluoreszenzhistogramm gut sichtbar darzustellen. Dies konnte durch die Regelung der einzelnen Kanalverstärkungen, der Kompensation und evtl. durch das Einbringen einer Messschwelle (Threshold) erreicht werden. Die so eingestellten Werte wurden als zelllinienspezifische, so genannte 'Instrument Settings' abgespeichert und konnten jederzeit abgerufen werden.

Die Auswertung der Messdaten (setzen der Marker etc.) erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences). Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft Corp.). Zur graphischen Darstellung wurde das Programm Sigma Plot (SPSS Science) verwendet.

Der Ablauf der Messungen und die Auswertung der Daten wurden bei jeder Messung, einem Standardprotokoll folgend, beibehalten.

3.12 Statistik

Statistische Analysen wurden mittels Sigma Plot V. 8.0 der Firma SPSS Science durchgeführt. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien wurde der zweiseitige Student-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,01$ angenommen. Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus Doppel- oder Tripelwerten der Messwerte einer Zelllinie.

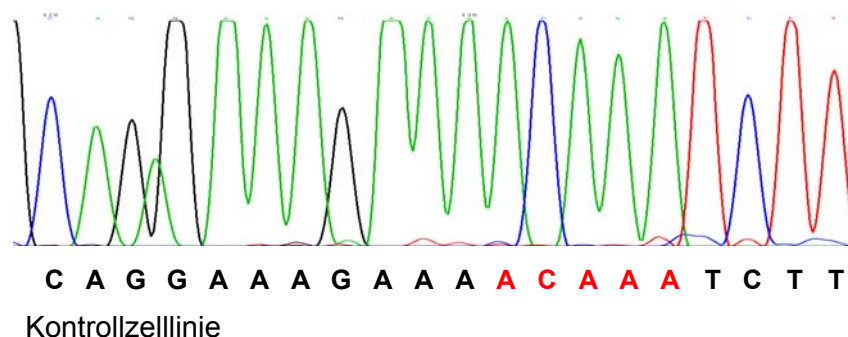
4 Ergebnisse

Ziel dieses Kapitels ist die Darstellung der wichtigsten Ergebnisse dieser Forschungsarbeit. Im Anschluss an den Nachweis der 657del5-Mutation in den verwendeten lymphoblastoiden NBS-Zelllinien durch Sequenzierung (vgl. Abschnitt 4.1) wurde das Wachstum der Zelllinien untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind unter 4.2 dargestellt. Unter 4.3 folgt die Darstellung der Ergebnisse zur Wachstumsinhibition der NBS-Zelllinien durch drei verschiedene Mutagene. Abschnitt 4.4 beinhaltet die grafische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse zur Induktion der Apoptose in sieben NBS- und zwei AT-Zelllinien. Eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgt im Abschnitt 4.5. In einer Übersichtstabelle sind die experimentellen Ergebnisse um klinische Daten zu Neoplasien der entsprechenden Patienten ergänzt (vgl. Tab. 4).

4.1 Mutationsnachweis durch Sequenzierung

Vor Beginn der Experimente wurden die verwendeten Zelllinien auf das Vorhandensein der 657del5-Mutation im Nbs1-Gen untersucht. Hierzu wurden zunächst PCR-Produkte der verschiedenen Linien gewonnen und im Anschluss eine Sequenzierungsreaktion durchgeführt (vgl. Abschnitte 3.5 und 3.6).

Bei Zellen gesunder Menschen findet sich auf Chromosom 8q21 an Position 657 im Nbs1-Gen die Basenabfolge ACAA (rot). Diese fünf Basen fehlen bei NBS-Patienten und führen zur 657del5 Mutation, die auch slawische Mutation genannt wird (vgl. Abb. 9).



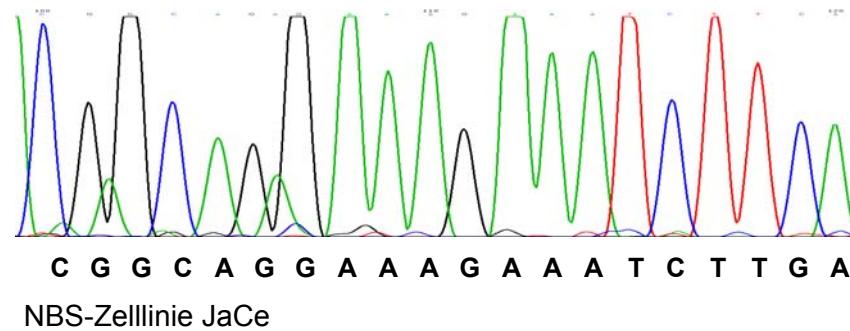


Abb. 9: Nachweis der 657del5-Mutation in Exon 6 des Nbs1-Gens der NBS-Zelllinie JaCe. Die 5 fehlenden Basen sind bei der Kontrollzelllinie vorhanden.

Die Mutation fand sich in allen unter 2.1 aufgeführten NBS-Zelllinien. Die Kontrollzelllinien wiesen keine Mutation auf.

4.2 Wachstumscharakteristika von NBS-Zellen

Es wurde das Wachstum lymphoblastoider NBS-Zellen in Kultur untersucht. Dies war zum einen zur Etablierung der Standardbedingungen für die Apoptoseversuche notwendig. Zum anderen interessierten vor dem Hintergrund der klinischen Variabilität des Krankheitsbildes evtl. auftretende Variationen im Wachstumsverhalten der Zellen.

4.2.1 Ermittlung der Ausgangszellzahl für die Apoptoseversuche

Ziel dieses Versuches war es, die optimale Ausgangszelldichte für die Apoptoseversuche zu ermitteln. Wie bereits erwähnt, ist bei Apoptosemessungen eine geringe spontane Apoptoserate (Hintergrundapoptose) von zentraler Bedeutung (vgl. Abschnitt 3.7). Die verwendeten Zellen müssen sich zum Messzeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, da Zellen, die bereits das Wachstumsplateau erreicht haben, durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel in die Apoptose eintreten und somit das Messergebnis verfälschen können. Andererseits darf die Zelldichte nicht zu gering sein, um ausreichend Zellen für die durchflusszytometrische Analyse zur Verfügung zu haben.

Über einen Zeitraum von acht Tagen wurde die Zunahme der Zellzahl bei drei verschiedenen Ausgangszellzahlen (3ml à 1,7; 3 und 5×10^5 Zellen/ml) in 6er-Multiwell-Platten verfolgt. Abbildung 10 zeigt beispielhaft das Wachstum einer NBS- und einer Kontrollzelllinie bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^5 Zellen/ml. Es wurden jeweils Doppelwerte ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Bei allen drei

Ausgangszellzahlen befanden sich die Zellen nach drei Tagen, also zum Zeitpunkt der geplanten Messung der Apoptoseraten, noch in der exponentiellen Wachstumsphase. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurden als Ausgangszellzahl für die Apoptoseversuche 3×10^5 Zellen/ml verwendet (vgl. Abschnitt 4.4).

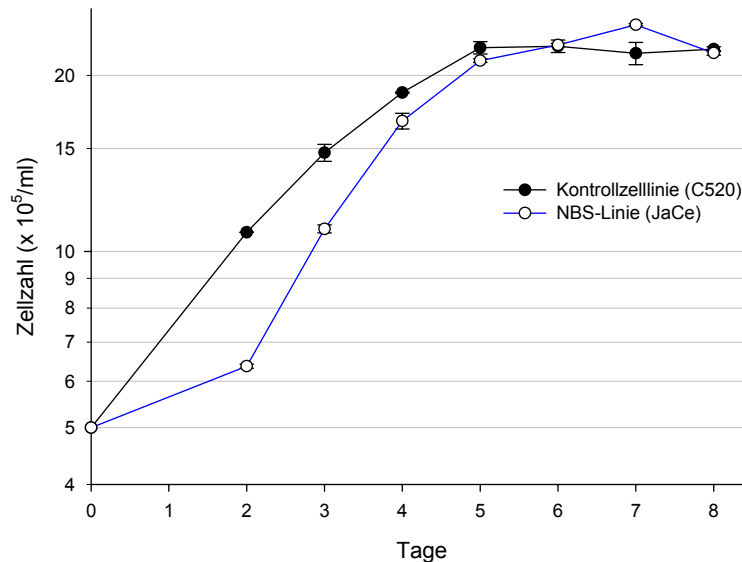


Abb. 10: Wachstum lymphoblastoider NBS-Zellen unter Versuchsbedingungen (Apoptoseversuche). Abgebildet ist das Zellwachstum bei einer Ausgangszelldichte von 5×10^5 Zellen/ml. Die Fehlerbalken geben die intraexperimentellen Variationen (Doppelwerte) an.

4.2.2 Wachstum von NBS-Zellen

Um das Wachstum mehrerer NBS-Zelllinien in vitro zu beurteilen, wurde die Zunahme der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet.

Der Versuchsansatz beinhaltete drei verschiedene Ausgangszellzahlen, 3×10^4 , 7×10^4 und 1×10^5 Zellen/ml. Es zeigte sich ein von der Ausgangszelldichte unabhängiges Wachstumsverhalten der Zellen: Wenn sich die Zellzahl einer Linie bei der Dichte von 3×10^4 Zellen/ml nach 7 Tagen versechsfachte, war dies auch bei 7×10^4 und 1×10^5 Zellen/ml der Fall. Beispielhaft ist hier das Ergebnis des Wachstums bei 7×10^4 Zellen/ml abgebildet. 7 Zelllinien wurden ausgewertet; zwei Kontrollzelllinien und 5 NBS-Linien. Es wurden jeweils Doppelwerte ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Zur

Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien war die Verdopplungszeit in Tagen in der exponentiellen Wachstumsphase Berechnungsgrundlage.

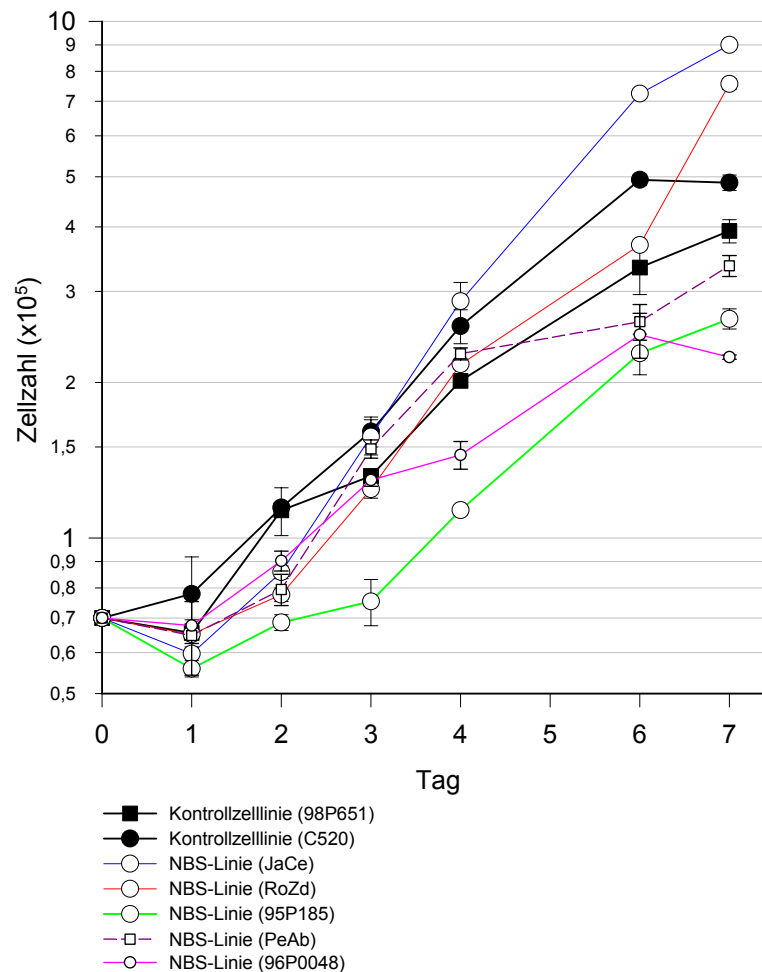


Abb. 11: Wachstum von fünf NBS- und zwei Kontrollzelllinien über sieben Tage bei einer Ausgangszellichte von $0,7 \times 10^5$ Zellen/ml. Die Fehlerbalken geben die intraexperimentellen Variationen (Doppelwerte) an.

Insgesamt fallen deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten auf (vgl. Abb. 11). Die Verdopplungszeit der beiden Kontrollzelllinien in der exponentiellen Wachstumsphase liegt bei 1,6 bzw. 2,2 Tagen. Nach 7 Tagen hat sich die absolute Zellzahl vervier- bis versiebenfacht. Bei der Kontrollzelllinie C520 und der NBS-Linie 96P0048 nimmt die Zellzahl von Tag 6 zu Tag 7 leicht ab, was das Erreichen der stationären Phase andeutet.

Drei NBS-Linien (JaCe, RoZd und PeAb) zeigen ein verglichen mit den Kontrollzellen rascheres Wachstum. In der exponentiellen Wachstumsphase verdoppeln sie ihre

Zellzahl bereits nach 0,8 (RoZd) bzw. 1,2 (JaCe, PeAb) Tagen. Die NBS-Zelllinien JaCe und RoZd haben ihre Ausgangszellzahl nach 7 Tagen etwa verdreizehnfacht. Auch zu diesem Zeitpunkt befinden sie sich noch nicht in der stationären Phase.

Eine weitere NBS-Linie (95P185) zeigt mit einer Verdopplungszeit von zwei Tagen eine den Kontrollzellen ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit. Etwas langsamer als die Kontrollzellen wächst die NBS-Linie 96P0048. Sie verdoppelt ihre Zellzahl erst nach 2,4 Tagen.

4.3 Wachstumsinhibition von NBS-Zellen

In Experimenten zur Wachstumsinhibition sollten NBS-Zellen im Hinblick auf ihre Sensitivität gegenüber drei verschiedenen Zytostatika untersucht werden. Gleichzeitig sollten geeignete Bleomycinkonzentrationen für die Apoptosemessungen am Durchflusszytometer ermittelt werden.

NBS- und Kontrollzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen Bleomycin, Methotrexat und Cyclophosphamid behandelt. Nach fünf Tagen wurde die Zellzahl im Coulter-Counter bestimmt, wobei nur vitale Zellen gezählt wurden. Zur Quantifizierung der Sensitivität gegenüber dem jeweiligen Mutagen wurden Dosen ermittelt, die notwendig waren, um den Anteil überlebender Zellen auf 50% zu reduzieren (LD_{50}).

Die Behandlung der Zellen mit *Bleomycin* führte bei allen Zelllinien zu einer Abnahme vitaler Zellen bei steigenden Mutagenkonzentrationen (vgl. Abb. 12). Bei den Kontrollzellen lag die LD_{50} bei etwa 0,52 μg Bleomycin/ml. Die LD_{50} der drei NBS-Linien lag zwischen 0,19 und 0,34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und war damit niedriger als die letale Dosis der Kontrollzellen. Dies bedeutet, dass bereits geringere Dosen Bleomycin bei NBS-Zellen zum Absterben der Zelle führen. Ein statistisch signifikanter Unterschied der zwei Gruppen fand sich bei der Bleomycinkonzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p = 0,0001$).

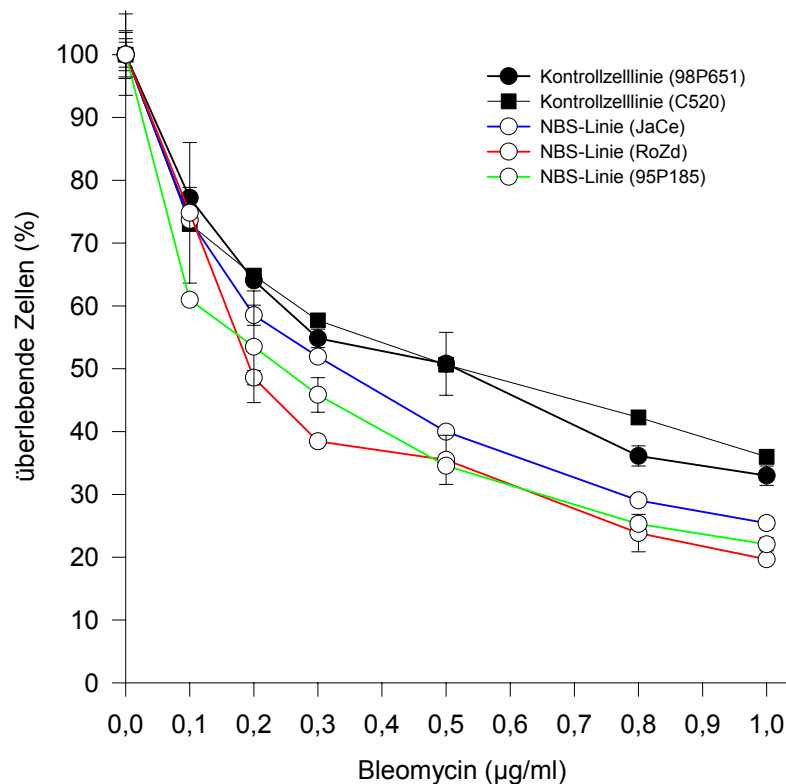


Abb. 12: Überlebensraten von drei NBS- und zwei Kontrollzelllinien nach der Inkubation mit ansteigenden Bleomycinkonzentrationen. Die Fehlerbalken geben die intraexperimentellen Variationen (Doppelwerte) an.

Die Behandlung mit *Methotrexat* führte ebenfalls zum konzentrationsabhängigen Absterben der Zellen (vgl. Abb. 13). Kontrollzelllinie C520 war mit einer LD_{50} von 12 nM *Methotrexat* dem Mutagen gegenüber am sensitivsten. Die NBS-Linien und die zweite Kontrollzelllinie wiesen keinen signifikanten Unterschied in der *Methotrexat*sensitivität auf.

Weiterhin zeigt die Grafik einen maximalen *Methotrexat*effekt bei einer Konzentration von 50 nM. Eine Verdopplung der Konzentration auf 100 nM zeigt keine weitere Zunahme der Anzahl toter Zellen.

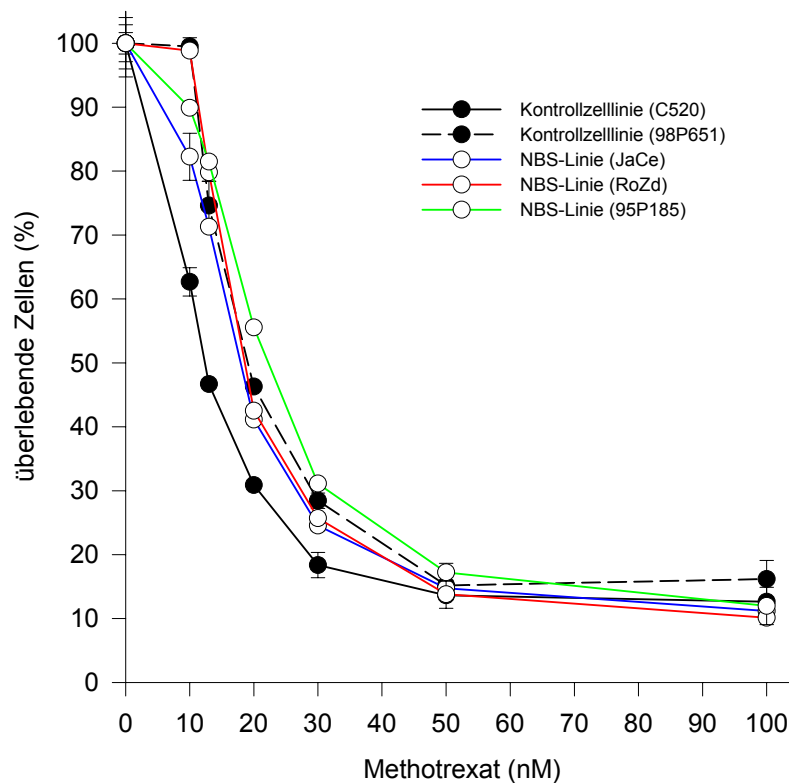


Abb. 13: Überlebensraten von drei NBS- und zwei Kontrollzelllinien bei Inkubation mit ansteigenden Methotrexatkonzentrationen. Die Fehlerbalken geben die intraexperimentellen Variationen (Doppelwerte) an.

Auch *Cyclophosphamid* führte in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer prozentualen Abnahme überlebender Zellen (vgl. Abb. 14). Zwischen NBS- und Kontrollzelllinien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Sensitivität. Die NBS-Linie JaCe hatte mit 0,25 mM *Cyclophosphamid* die niedrigste LD₅₀.

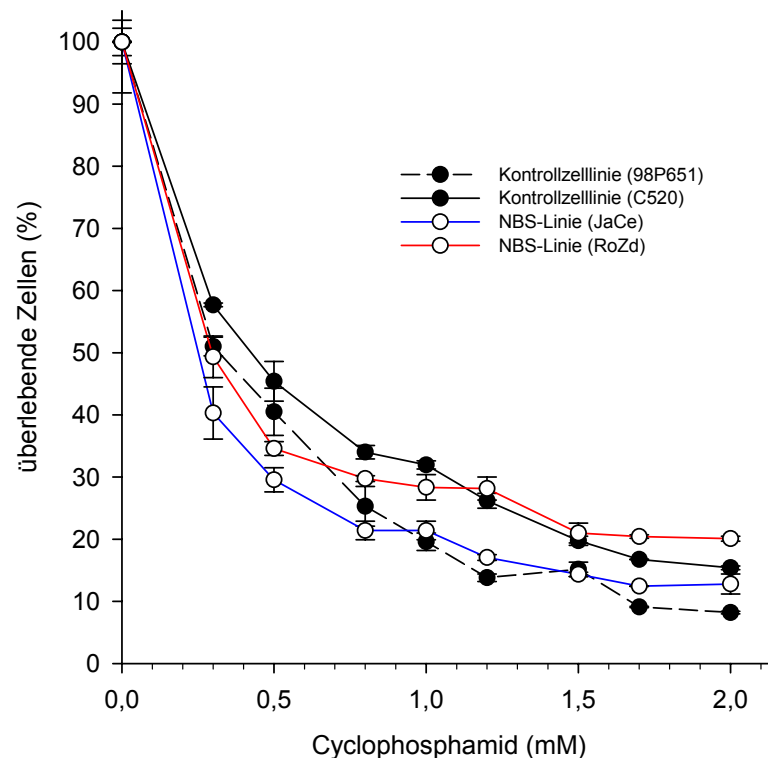


Abb. 14: Überlebensraten von zwei NBS- und zwei Kontrollzelllinien bei Inkubation mit ansteigenden Cyclophosphamidkonzentrationen. Die Fehlerbalken geben die intra-experimentellen Variationen (Doppelwerte) an.

4.4 Induktion der Apoptose in NBS-Zellen

4.4.1 Etablierung der Standardbedingungen für die Apoptoseversuche

Vor Beginn der eigentlichen Versuche zur Induktion der Apoptose in NBS-Zellen nach Bleomycinbehandlung (vgl. Abschnitte 4.4.2 und 4.4.3) mussten zunächst Standardbedingungen etabliert werden. Hierzu mussten der zeitliche Verlauf der Apoptose nach DNA-Schädigung sowie die zu verwendenden optimalen Bleomycinkonzentrationen ermittelt werden. Der Apoptosenachweis erfolgte hierbei durch Annexin-V-Färbung (ausführliche Darstellung der Methode unter Abschnitt 3.10.3 und 4.4.3). Zunächst sollten die in den Wachstumsinhibitionsexperimenten getesteten Bleomycinkonzentrationen von 0,1 bis 1 µg/ml für die durchflusszytometrischen Apoptoseversuche übernommen werden (vgl. Abb. 12). Allerdings erwiesen sich diese als nicht ausreichend, um nach Annexin-V-Färbung im Durchflusszytometer nachweisbare apoptotische Effekte zu erzeugen. Konzentrationen wie 1 µg

Bleomycin/ml, die im Wachstumsinhibitionsexperiment bereits zum Absterben von 80% der Zellen geführt hatten, zeigten durchflusszytometrisch nach Annexinfärbung Apoptoseraten von nur etwa 4%. Dies erforderte die exakte Bestimmung der Apptoseraten am Durchflusszytometer bei variierenden Ausgangskonzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Apoptoseinduktion. Hierzu wurden eine Kontroll- und eine NBS-Zelllinie verwendet, die mit ansteigenden Bleomycinkonzentrationen (1, 10 und 30 µg/ml) behandelt wurden. Unbehandelte Zellen beider Linien wurden zur Ermittlung der Hintergrundapoptose mitgeführt (vgl. Abschnitt 3.7). An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich eintretender Apoptose untersucht.

Abbildung 15 zeigt die Verteilung vitaler, apoptotischer und spätapoptotischer/nekrotischer Zellen bei unbehandelten (a) im Vergleich zu mit 30 µg Bleomycin/ml (b) behandelten Zellen im Verlauf von fünf Tagen. Dargestellt sind exemplarisch die Messwerte einer der beiden getesteten Zelllinien.

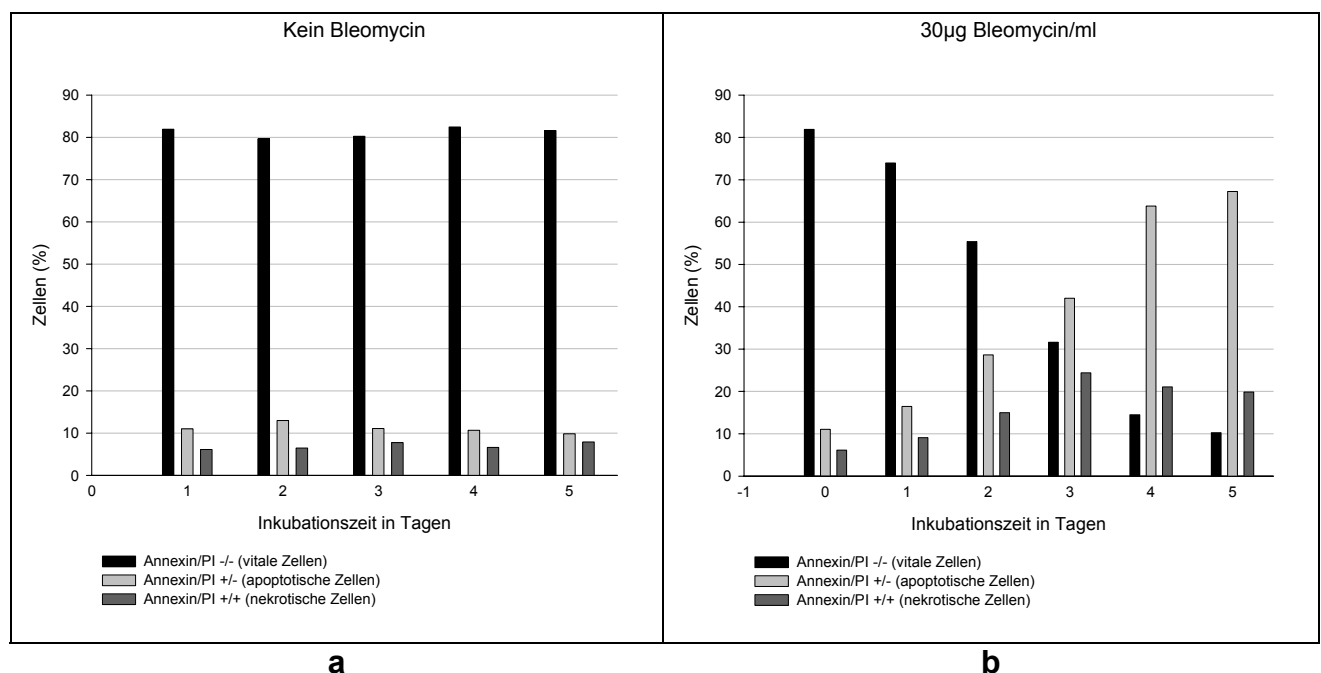


Abb. 15: Anteile vitaler (schwarz), apoptotischer (hellgrau) und nekrotischer (dunkelgrau) Zellen bei unbehandelten (a) im Vergleich zu mit 30 µg Bleomycin/ml inkubierten Zellen (b) über fünf Tage (Zelllinie: Kontrollzelllinie C520).

In der Gruppe der unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 15a) zeigten sich über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstante Populationsverhältnisse. Die vitalen

Zellen bildeten mit ca. 80% die größte Gruppe. Der apoptotische Anteil lag konstant bei etwa 10%, der spätapoptotischer/nekrotischer Zellen bei 7%.

Anders zeigte sich die Verteilung bei den mit 30 µg Bleomycin/ml behandelten Zellen (vgl. Abb. 15b). Hier nahm die Zahl lebender Zellen von anfangs 80% stetig bis auf 10% am fünften Tag ab. Apoptotische Zellen stiegen von 10% zu Anfang auf 67% nach 5 Tagen Bleomycininkubation an. Die Zahl nekrotischer Zellen stieg von 7% auf 24% nach dreitägiger Inkubation. Anschließend fiel der Anteil wieder leicht ab.

Abbildung 16 zeigt die Zunahme früh- und spätapoptotischer/nekrotischer Zellen zusammengefasst über die Zeit bei zwei getesteten Zelllinien (einer Kontrollzelllinie und der NBS-Linie JaCe). Die Zellen wurden mit 1, 10 und 30 µg/ml Bleomycin für fünf Tage inkubiert. Die Ergebnisse der Inkubation mit 1 µg/ml sind nicht dargestellt, da sich keine Apoptose induzieren ließ. Abgebildet ist der Apoptoseverlauf bei den Konzentrationen 10 und 30 µg Bleomycin/ml.

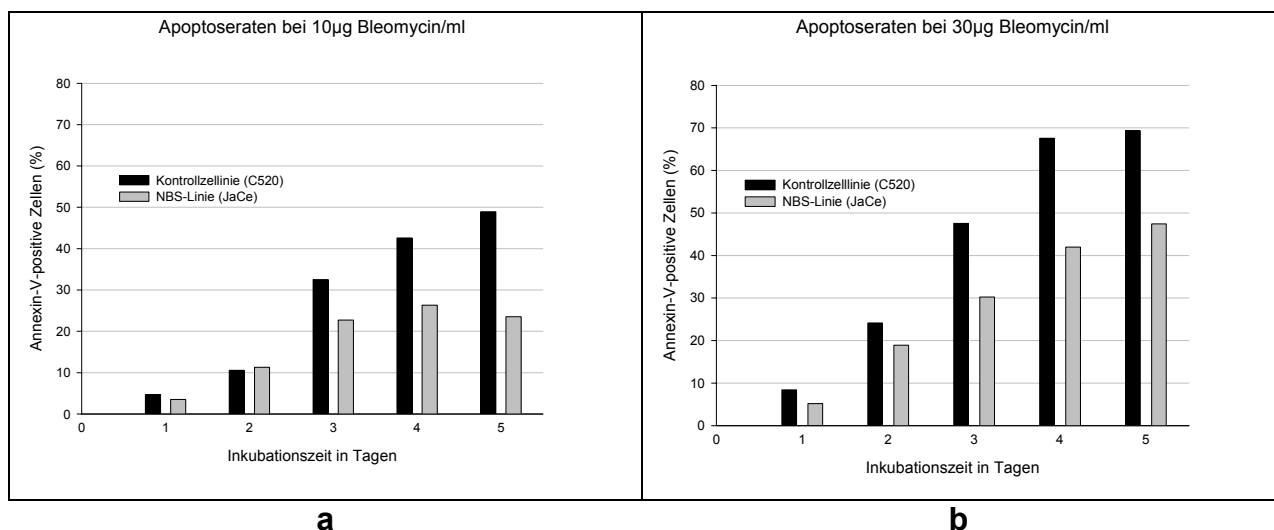


Abb. 16: Durchflusszytometrisch ermittelte Apoptoseraten einer Kontrollzelllinie und der NBS-Linie JaCe bei fünftägiger Inkubation mit 10 µg (a) und 30 µg (b) Bleomycin/ml. Der schwarze Balken stellt den Anteil apoptotischer Kontrollzellen, der graue Balken den Anteil apoptotischer NBS-Zellen dar. Als apoptotisch gelten alle Annexin-V-positiven Zellen (Ax+/PI- und Ax+/PI+ - Zellen).

Insgesamt zeigte sich eine mit ansteigenden Bleomycinkonzentrationen und längerer Inkubationsdauer zunehmende Apoptoserate. In Abbildung 16a erkennt man bei der Inkubation mit 10 µg Bleomycin/ml bei beiden Zelllinien im Verlauf der Zeit eine stetige Zunahme apoptotischer Zellen. Bei der Kontrollzelllinie stieg die Apoptoserate von

anfangs 4,7% auf 49% nach fünf Tagen. Die NBS-Linie JaCe zeigte mit 11,3% am zweiten Tag noch eine der Kontrollzelllinie ähnliche Apoptoserate, blieb dann jedoch mit einer maximalen Rate von 26,3% am 4. Tag unter dem Maximalwert der Kontrollzelllinie (49%) am 5. Tag. Vom 4. auf den 5. Tag fiel die Apoptoserate der NBS-Linie von 26,3% auf 23,5% leicht ab.

Bei der Inkubation mit 30 µg Bleomycin/ml zeigten sich, entsprechend der höheren Mutagenkonzentration, an allen Tagen höhere Apoptoseraten (vgl. Abb. 16b). Bei den Kontrollzellen stieg der Anteil apoptotischer Zellen von initial 8,4% stetig auf 70% nach fünf Tagen. Die Apoptoserate der NBS-Linie blieb erneut hinter der Rate der Kontrollzelllinie zurück und erreichte einen Maximalwert von 47% zu Versuchsende.

4.4.2 Apoptosenachweis mit der sub-G1-Peak-Methode

Eine spezifische, vielfach verwendete Methode, Apoptose durchflusszytometrisch nachzuweisen, ist die sub-G1-Peak- oder NICOLETTI-Methode (vgl. Abschnitt 3.10.2). Sie basiert auf dem geringeren DNA-Gehalt apoptotischer Zellen im Vergleich zu vitalen Zellen. Werden die Zellen mit Propidiumiodid (PI), einem DNA-Farbstoff, gefärbt, fluoreszieren apoptotische weniger intensiv als vitale Zellen.

Ein Beispiel zeigen die folgenden Histogramme. Histogramm 17a zeigt unbehandelte, PI-gefärbte Zellen. Propidiumiodid hat sich in die DNA eingelagert und fluoresziert in zwei schmalen Peaks, die Zellen in der G1-Phase (linker Peak) mit einfachem und Zellen in der G2-Phase (rechter Peak) mit doppeltem DNA-Gehalt repräsentieren. Im darunter liegenden Fluoreszenzbereich, der durch den Marker M1 begrenzt wird, finden sich nur 6,3% der Zellen. Dies bedeutet einen Gesamtanteil apoptotischer Zellen von 6,3% bei unbehandelten Lymphoblasten.

Histogramm 17b zeigt dagegen einen breiten sub-G₁-Peak (Marker M1) von 47,4%. Dies stellt den Anteil apoptotischer Zellkerne nach dreitägiger Bleomycinbehandlung dar.

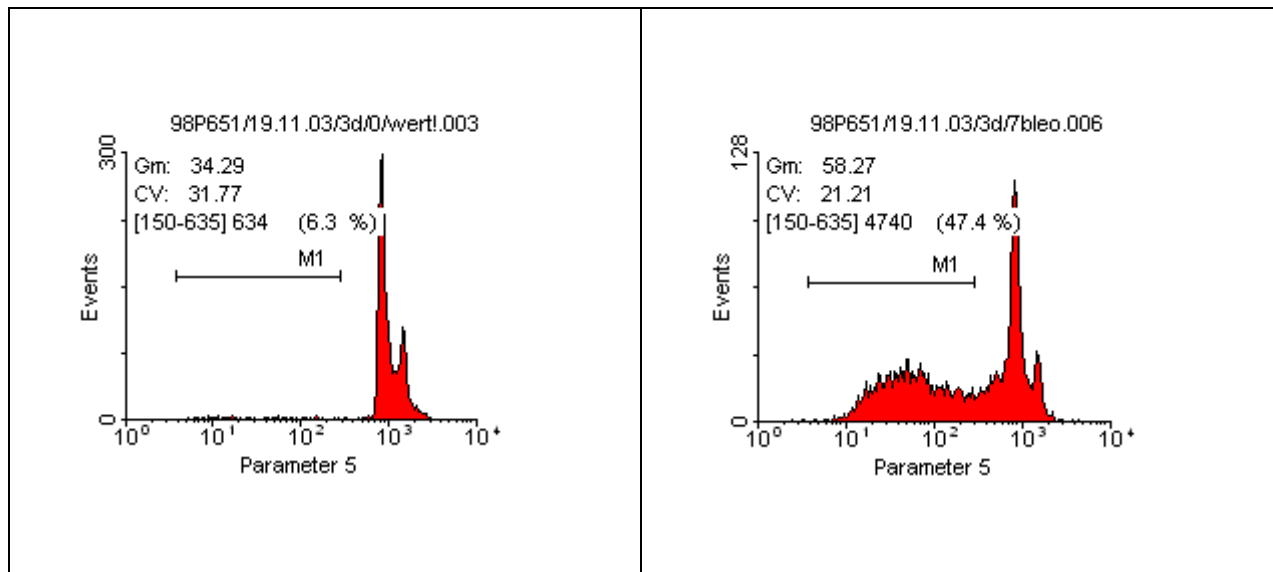


Abb. 17: Apoptosenachweis mit der sub-G₁-peak-Methode. Unbehandelte Zellen (a) zeigen keinen sub-G₁-peak. Bei mit Bleomycin behandelten Zellen (b) findet sich ein breiter sub-G₁-peak, der die apoptotischen Zellkerne repräsentiert.

Im folgenden Experiment wurde die Apoptoseinduktion bei sieben NBS-, zwei AT- und zwei Kontrollzelllinien mit Hilfe der sub-G₁-Peak-Methode untersucht. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 72 Stunden mit 10 bzw. 30 µg Bleomycin pro ml Zellsuspension inkubiert (vgl. Abschnitt 3.10.1). Für jede Zelllinie wurden pro Bleomycinkonzentration drei Vertiefungen à 3 ml mit 1×10^6 Zellen angesetzt. Zur Ermittlung der Hintergrundapoptose wurden von jeder Zelllinie unbehandelte Zellen mitgeführt. Nach drei Tagen wurden alle Zelllinien mit PI gefärbt (NICOLETTI-Puffer) und durchflusszytometrisch analysiert. Aus den drei Messwerten der mit Bleomycin versetzten Zellen wurde der Mittelwert berechnet und die Rate der Hintergrundapoptose subtrahiert. Anschließend wurden die Apoptoseraten der Patientenzelllinien mit denen der gesunden Kontrollzelllinien verglichen, wobei die Messwerte der Kontrollzellen als Referenz für den t-Test dienten.

Abbildung 18 stellt die Apoptoseraten der Zelllinien graphisch dar. Insgesamt fallen hohe Apoptoseraten von bis zu 80% sowie große Unterschiede zwischen den Raten der einzelnen Zelllinien auf.

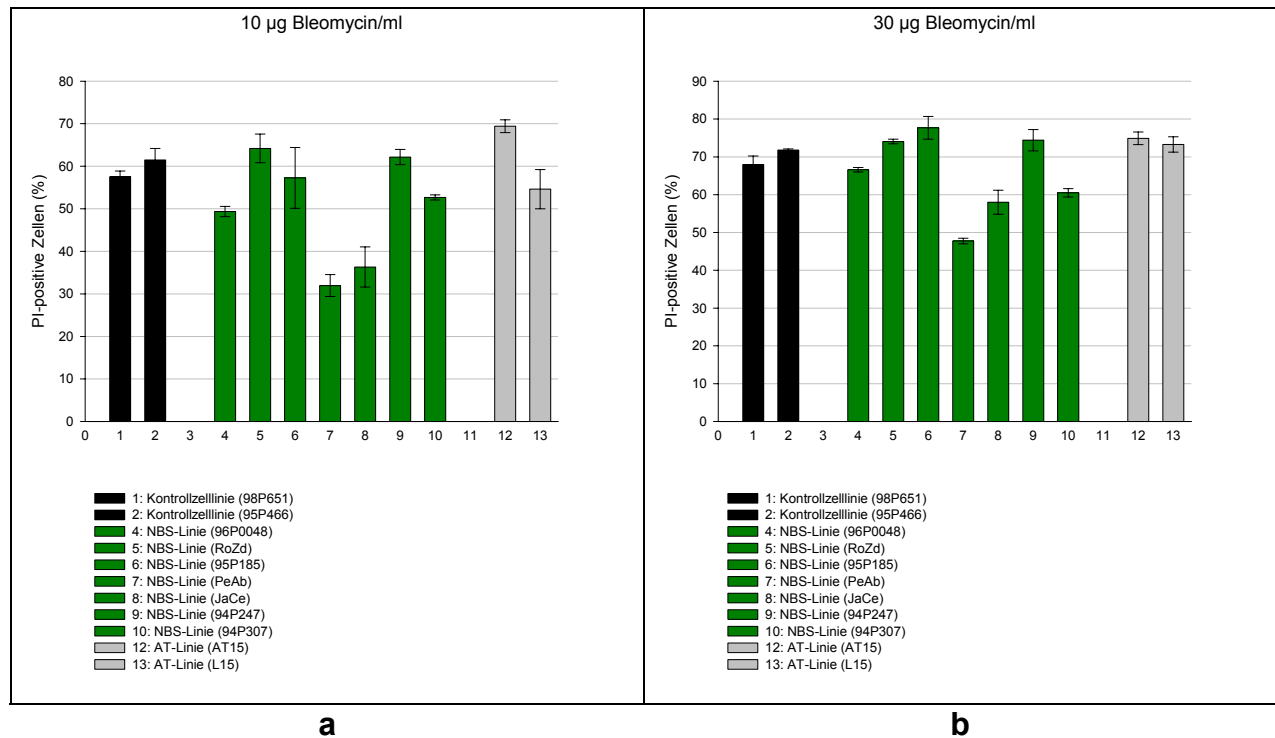


Abb. 18: Hypodiploider DNA-Gehalt (%) nach 72 h Inkubation mit 10 und 30 µg Bleomycin/ml. 7 NBS-, zwei AT- und zwei Kontrollzelllinien wurden untersucht. Die Fehlerbalken geben die intraexperimentellen Variationen (Tripelwerte) an.

Abbildung 18a zeigt die Apoptoseraten nach der Inkubation mit 10 µg Bleomycin/ml. Nach 72 Stunden erreichten die Kontrollzellen eine mittlere Apoptoserate etwa 60%. Im Vergleich dazu zeigten NBS- und AT-Zellen stärker variierende Apoptoseindices – einige Zelllinien wiesen Apoptoseraten ähnlich den Kontrollzellen auf, andere zeigten deutlich niedrigere oder höhere Raten. Zur ersten Gruppe gehören drei NBS-Linien (RoZd, 95P185, 94P247). Sie zeigten Apoptoseraten im Bereich von 57-64%. Ein etwas höherer Apoptoseindex fand sich bei der AT-Linie AT15 mit 69%. Durch Anwendung des t-Tests zeigte sich, dass vier NBS-Linien (96P0048, PeAb, JaCe, 94P307) dagegen signifikant niedrigere Apoptoseindices als die Kontrollzellen aufwiesen. Besonders niedrig waren die Apoptoseindices der NBS-Zelllinien PeAb und JaCe mit 32% bzw. 36%, also nur etwa der Hälfte der Indices der Kontrollzelllinien. Die AT-Zelllinie L15 zeigte eine Tendenz zur niedrigeren Apoptose ohne statistische Signifikanz.

Die Apoptoseraten nach 72stündiger Inkubation mit 30 µg Bleomycin/ml sind in Abbildung 18b dargestellt. Im Vergleich zur Inkubation mit 10 µg Bleomycin/ml haben die Apoptoseindices aller Zelllinien im Durchschnitt um 25,9% zugenommen.

Der Anteil apoptotischer Kontrollzellen hat sich im Vergleich zur niedrigeren Bleomycinkonzentration um 17,5% auf durchschnittlich 70% gesteigert. Die drei NBS-Zelllinien (RoZd, 95P185, 94P247), die bereits bei 10 µg Bleomycin laut t-Test keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Apoptoserate der Kontrollzelllinien gezeigt hatten, sind auch hier, wie nun auch die NBS-Zelllinie 96P0048, in diesem Bereich anzusiedeln. Auch beide AT-Zelllinien zeigten eine etwa den Kontrollzellen entsprechende Apoptoserate.

Signifikant geringere Apoptoseraten im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten sich erneut bei den drei NBS-Linien PeAb, JaCe und 94P307.

Tab. 2: Mit der sub-G1-peak-Methode gemessene Apoptoseraten nach Inkubation mit 10 und 30 µg Bleomycin/ml. Angegeben ist der Mittelwert von Tripelwerten inklusive Standardabweichung. Signifikanz bezieht sich auf den Unterschied der Messwerte der NBS- bzw. AT-Zelllinien zum Mittelwert der Kontrollzelllinien. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,01$ angenommen.

Zelllinie	10 µg Bleomycin/ml		30 µg Bleomycin/ml	
	hypodiploider DNA-Gehalt (%)	Signifikanz ($p < 0,01$)	hypodiploider DNA-Gehalt (%)	Signifikanz ($p < 0,01$)
NBS-Linien				
96P0048	49,4 ± 1,22	+	66,6 ± 0,61	-
RoZd	64,2 ± 3,36	-	74,1 ± 0,62	-
95P185	57,3 ± 7,16	-	77,7 ± 3,01	+
PeAb	32 ± 2,57	+	47,7 ± 0,74	+
JaCe	36,3 ± 4,72	+	58 ± 3,19	+
94P247	62,2 ± 1,78	-	74,4 ± 2,81	-
94P307	52,7 ± 0,61	+	60,5 ± 1,12	+
AT-Linien				
AT15	69,4 ± 1,51	+	74,9 ± 1,67	-
L15	54,6 ± 4,6	-	73,3 ± 2,02	-
Kontrollzellen n = 2	59,5 ± 2,88		69,9 ± 2,57	

+: signifikant abweichende Apoptoserate, -: kein signifikanter Unterschied der Apoptoserate zu den Kontrollzellen (t-Test).

4.4.3 Apoptosenachweis mit der Annexin-V-Färbung

Zur Verifizierung der mittels sub-G₁-Peak-Methode gemessenen Apoptoseraten wurden die Zelllinien zusätzlich mit der Annexin-V-Färbung untersucht. Diese Methode ist spezifischer als die sub-G₁-peak-Methode und basiert auf der Anfärbung von in einem frühen Apoptosestadium von der Membraninnen- auf die -außenseite translozierenden Phosphatidylserinen [Vermes et al., 1995]. Propidiumiodid (PI) wird auch hier verwendet, allerdings dient es lediglich der Gegenfärbung der Zellen. Als DNA-Farbstoff kann es die DNA nur bei spätapoptotischen/nekrotischen Zellen anfärben, deren Zellmembran löchrig und somit für PI durchlässig geworden ist. Demzufolge hat es hier, im Gegensatz zur sub-G₁-peak-Methode, nur qualifizierende und keine quantifizierende Funktion.

Abbildung 19 zeigt beispielhaft drei Dot-Plot-Diagramme einer Zelllinie nach dreitägiger Inkubation mit 0, 10 und 30 µg Bleomycin/ml. Der linke untere Quadrant beinhaltet die vitale Zellpopulation. Die Zellen binden weder Annexin-V noch PI und zeigen deshalb keine Fluoreszenz. Im rechten unteren Quadranten finden sich frühapoptotische (Ax+/PI-), im rechten oberen Quadranten spätapoptotische und nekrotische (Ax+/PI+) Zellen.

Im linken Teil der Abbildung erkennt man die niedrige Apoptoserate unbehandelter Zellen. Die größte Gruppe bilden vitale Zellen mit 89,3%. Frühapoptotisch sind 6,1%, spätapoptotisch 4,2% der Zellen. Unter Bleomycinbehandlung kommt es konzentrationsabhängig zu einer Verschiebung der Populationen. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen nimmt ab, während früh- und spätapoptotische Zellen zunehmen. Nach Inkubation mit 30 µg Bleomycin/ml ist die Zahl vitaler Zellen von 89,3% auf 42,4% gefallen. Der Anteil frühapoptotischer ist von 6% auf 37,4%, der spätapoptotischer/nekrotischer Zellen von 4,2% auf 18,8% gestiegen.

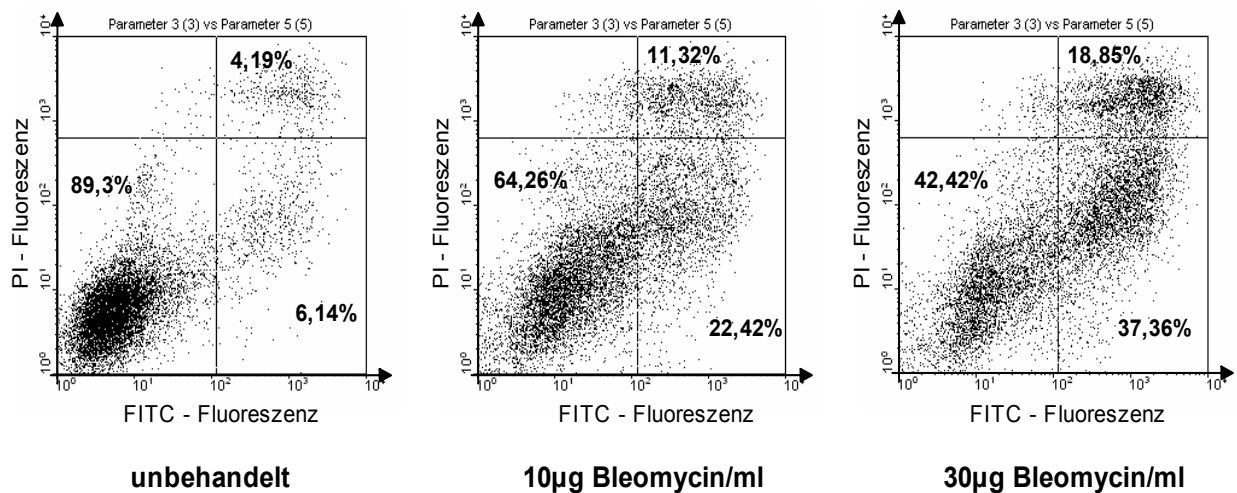


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse Annexin-V/PI-gefärbter Zellen nach Inkubation mit 0, 10 und 30 µg Bleomycin/ml für 72 h. Annexin-V ist durch FITC markiert. Der linke untere Quadrant zeigt vitale, der rechte untere apoptotische und der rechte obere Quadrant spätapoptotische/nekrotische Zellen (%).

Im folgenden Experiment wurde die Apoptoseinduktion bei sieben NBS-, zwei AT- und zwei Kontrollzelllinien mit Hilfe der Annexin-V-Methode untersucht. Hierzu wurden die Zellen, analog zum Verfahren bei der sub-G₁-peak-Methode (vgl. Abschnitt 4.4.2), für 72 Stunden mit 10 bzw. 30 µg Bleomycin pro ml Zellsuspension inkubiert (vgl. Abschnitt 3.10.1). Für jede Zelllinie wurden pro Bleomycinkonzentration drei Vertiefungen à 3 ml mit 1×10^6 Zellen angesetzt. Unbehandelte Zellen jeder Zelllinie wurden zur Ermittlung der Hintergrundapoptose mitgeführt. Nach drei Tagen wurden alle Zelllinien mit Annexin-V angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aus den drei Messwerten der mit Bleomycin versetzten Zellen wurde der Mittelwert berechnet und die Rate der Hintergrundapoptose subtrahiert. Anschließend wurden die Apoptoseraten der Patientenzelllinien mit denen der gesunden Kontrollzelllinien verglichen, wobei die Messwerte der Kontrollzellen als Referenz für den t-Test dienten.

Abbildung 20 stellt die prozentualen Apoptoseanteile graphisch dar. Auffällig sind zunächst die im Vergleich zur sub-G₁-Peak-Methode bei gleichen Mutagenkonzentrationen insgesamt niedrigeren Apoptoseindices (vgl. Abb. 18). Auch hier zeigten sich, ebenso wie bei den PI-Versuchen, deutliche Unterschiede in den Apoptoseindices der einzelnen Zelllinien.

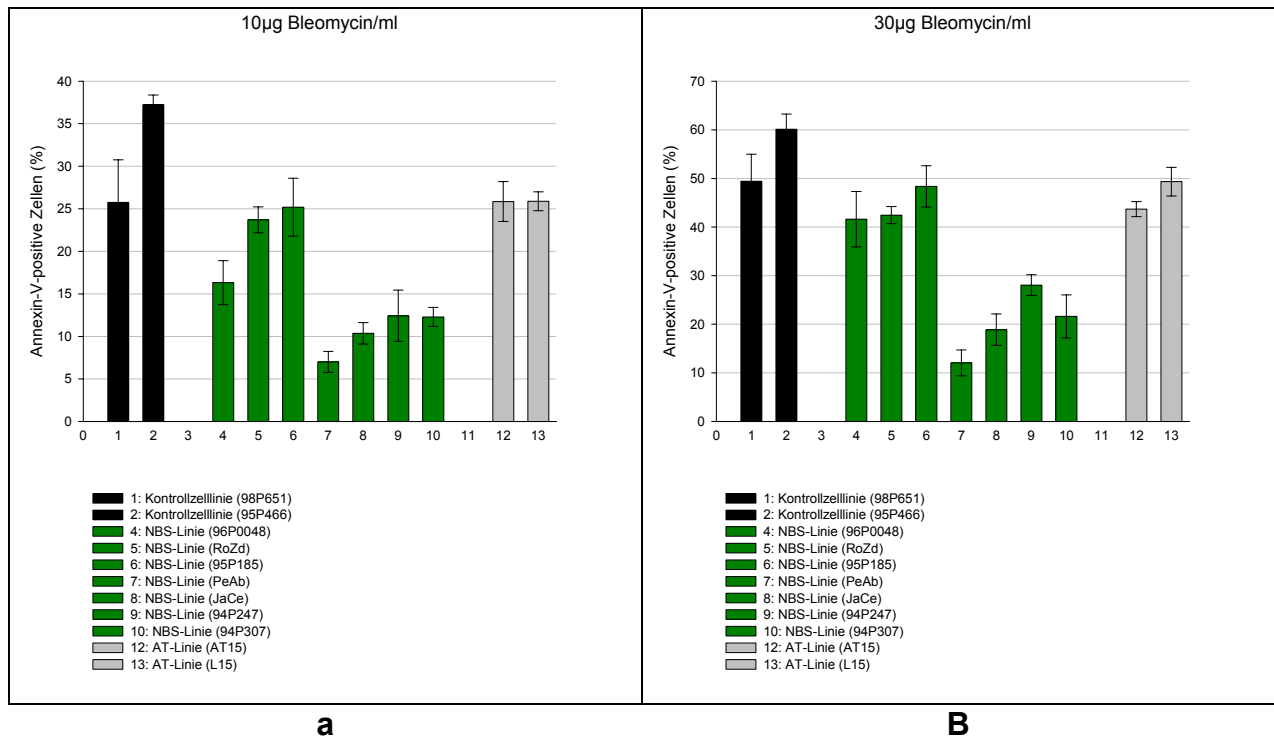


Abb. 20: Ax+/PI- und Ax+/PI+ -Zellen nach 72 h Inkubation mit 10 und 30 µg Bleomycin/ml. 7 NBS- zwei AT- und zwei Kontrollzelllinien wurden untersucht. Die Fehlerbalken geben die intraexperimentellen Variationen (Tripelwerte) an.

Bei 10 µg Bleomycin/ml (vgl. Abb. 20a) lag der Anteil apoptotischer Kontrollzellen im Mittel bei etwa 30%. Die Apoptoseraten aller NBS-Zelllinien lagen unter den mittleren Raten der Kontrollzellen. Im Vergleich der jeweiligen Apoptoseraten der NBS- und AT-Zelllinien mit den Kontrollzelllinien mittels t-Test gab es Zelllinien, die Raten im Bereich der Kontrollzellen aufwiesen, und solche, die signifikant nach unten abweichende Apoptoseraten zeigten.

Zur ersten Gruppe gehören drei NBS- (96P0048, RoZd, 95P185) sowie beide AT-Zelllinien, wobei die NBS-Zelllinie 96P0048 eine Tendenz zur niedrigeren Apoptose zeigte. Die vier NBS-Linien der zweiten Gruppe (PeAb, JaCe, 94P247, 94P307) zeigten im t-Test in Relation zu den Kontrollzellen signifikant niedrigere Apoptoseraten ($p = 4,5 \times 10^{-7}$). Die niedrigste Rate trat bei der NBS-Linie PeAb mit nur 7% apoptotischen Zellen auf. Die drei NBS-Linien JaCe, 94P247 und 94P307 lagen mit im Durchschnitt 11,7% Apoptose nur bei etwa $\frac{1}{3}$ der mittleren Apoptoseraten der Kontrollzellen.

Die Inkubation mit 30 µg Bleomycin/ml führte bei allen Zelllinien zu höheren Apoptoseraten (vgl. Abb. 20b). Die mittlere Apoptoserate der Kontrollzellen lag jetzt bei

55% und damit im Vergleich zur Rate bei 10 µg Bleomycin um 45,5% höher. Erneut zeigten alle untersuchten NBS-Zelllinien Apoptoseraten unterhalb des Mittelwerts der Kontrollzellen. Vergleicht man die durchschnittlichen Apoptoseraten der einzelnen NBS- und AT-Zelllinien mit dem Mittelwert der Kontrollzellen, lassen sie sich wieder in die bereits bei 10 µg Bleomycin beobachteten Gruppen einteilen:

Drei NBS-Linien (96P0048, RoZd, 95P185) und beide AT-Linien erreichen erneut Apoptoseraten ähnlich den Kontrollzellen, wobei sich insgesamt eine Tendenz zur niedrigeren Apoptose zeigt.

Vier NBS-Zelllinien (PeAb, JaCe, 94P247, 94P307) zeigen mit durchschnittlich 20% ebenso wie bei der Behandlung mit 10µg Bleomycin/ml signifikant niedrigere Apoptoseraten verglichen mit den durchschnittlichen Raten der Kontrollzelllinien ($p = 2 \times 10^{-8}$).

Tab. 3: Mit der Annexin-V-Methode gemessene Apoptoseraten nach Inkubation mit 10 und 30 µg Bleomycin/ml. Angegeben ist der Mittelwert von Tripelwerten inklusive Standardabweichung. Signifikanz bezieht sich auf den Unterschied der Messwerte der NBS- bzw. AT-Zelllinien zum Mittelwert der Kontrollzelllinien. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,01$ angenommen.

Zelllinie	10 µg Bleomycin/ml				30 µg Bleomycin/ml			
	Ax+/PI- Zellen (%)	Ax+/PI+ Zellen (%)	Ax-pos. Zellen (%) (gesamt)	Sig. $p < 0,01$	Ax+/PI- Zellen (%)	Ax+/PI+ Zellen (%)	Ax-pos. Zellen (%) (gesamt)	Sig. $p < 0,01$
NBS-Linien								
96P0048	13,3	3,0	16,3 ± 2,59	-	32,8	8,8	41,6 ± 5,68	-
RoZd	13,7	10,0	23,7 ± 1,52	-	26,5	16,0	42,5 ± 1,75	-
95P185	16,3	8,9	25,2 ± 3,4	-	34,8	13,6	48,4 ± 4,26	-
PeAb	5,4	1,6	7 ± 1,23	+	8,5	3,5	12 ± 2,66	+
JaCe	7,3	3,1	10,4 ± 1,27	+	13,2	5,7	18,9 ± 3,24	+
94P247	7,7	4,7	12,4 ± 3,0	+	17,7	10,4	28,1 ± 2,13	+
94P307	7,4	4,9	12,3 ± 1,12	+	14,2	7,4	21,6 ± 4,43	+
AT-Linien								
AT15	20,6	5,3	25,9 ± 2,34	-	35,0	8,7	43,7 ± 1,55	-
L15	17,2	8,7	25,9 ± 1,11	-	33,0	16,4	49,4 ± 2,94	-
Kontroll- zellen n = 2	20,2	11,3	31,5 ± 7,23		40,2	14,5	54,7 ± 7,12	

+ : signifikant verminderte Apoptoserate, - : kein signifikanter Unterschied der Apoptoseraten zu den Kontrollzellen (t-Test). Ax: Annexin-V, PI: Propidiumiodid, pos.: positiv, Sig.: Signifikanz.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: Bei den Untersuchungen zum Zellwachstum zeigte sich eine starke Variabilität der Wachstumsgeschwindigkeiten der Zelllinien untereinander, wobei keine Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Apoptoseinduktion erkennbar war. In den Wachstumsinhibitionsexperimenten zeigte sich eine erhöhte Sensitivität von NBS-Zellen auf das Radiomimetikum Bleomycin. Diese Sensitivität bestand bei den auf anderen Wirkmechanismen beruhenden Mutagenen Cyclophosphamid und Methotrexat nicht.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Apoptose wurden mit zwei unabhängigen Färbemethoden – der sub-G1-peak-Methode und der Annexin-V-Färbung – durchgeführt. Bei beiden Methoden zeigten sich Unterschiede in den Apoptoseindices der NBS-Zellen, wobei es Zelllinien mit Apoptoseraten im Bereich der Kontrollzelllinien und solche mit im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduzierten Apoptoseraten gab. Bei der Untersuchung mit der Annexin-V-Färbung lagen die Apoptoseraten aller NBS-Zelllinien unter dem Mittelwert der Raten der Kontrollzelllinien.

Drei von sieben untersuchten NBS-Zelllinien zeigten bei beiden Nachweismethoden durchgehend signifikant niedrigere Apoptoseraten als die Kontrollzelllinien. Zwei weitere NBS- sowie beide AT-Zelllinien zeigten dagegen durchgängig den Kontrollzellen ähnliche Apoptoseraten. Die übrigen beiden NBS-Zelllinien (96P0048 und 94P247) ließen sich nicht durchgehend einer der beiden Gruppen zuordnen. In den Annexinversuchen gehörte die NBS-Zelllinie 96P0048 aber stets der Gruppe mit normaler Apoptoserate, die Zelllinie 94P247 dagegen der Gruppe mit niedrigerer Apoptoseinduktion an.

Eine zusammenfassende Darstellung der experimentellen Ergebnisse in Ergänzung der klinischen Daten zur Malignomentstehung zeigt Tabelle 4. Auf Grundlage der bei den Untersuchungen zur Apoptoseinduktion aufgetretenen Verteilung der Apoptoseraten wurden die NBS-Zelllinien in zwei Gruppen eingeteilt - eine Gruppe mit im Normalbereich liegender und eine mit signifikant nach unten abweichender Apoptoserate. Für beide Gruppen wurden die mittleren Apoptoseraten berechnet und mittels t-Test mit dem Durchschnittswert der Kontrollzellen verglichen.

Tab. 4: Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse. Die Daten zur Apoptose wurden aus den spezifischeren Annexin-Versuchen bezogen. Klinische Daten zu Neoplasien sind ergänzt.

Gruppe	Apoptoserate (%) (MW \pm SD)	Apoptoserate (%) (MW \pm SD)	Wachstum (MW)	Wachstumsinhibition (LD50) (MW)			Malignom, Erkrankungsalter	YOB
				BLM (μ g/ml)	MTX (nM)	CPA (mM)		
	10 μ g BLM/ml	30 μ g BLM/ml	VZ in Tagen					
normale Apoptose- rate	21,7 \pm 4,93% n = 3 p = n. s.	44,2 \pm 4,61% p = n. s.	1,6	0,22	20	0,3	1) Meningeom, 11J	1979
							2) kein Malignom	1989
							3) kein Malignom	1993
niedrige Apoptose- rate	10,5 \pm 2,77% n = 4 p = 4,5 \times 10 ⁻⁷	20,2 \pm 6,6% p = 2 \times 10 ⁻⁸	1,2	0,34	18	0,3	4) ALL, 15J und M. Hodgkin, 17J	1980
							5) NHL, 23J	1975
							6) T-NHL, 24J	1977
							7) B-NHL, 11J	1980
AT	25,9 \pm 1,64% n = 2 p = n. s.	46,6 \pm 3,8% p = n. s.	-	-	-	-		
Kontrollzellen	31,5 \pm 7,23% n = 2	54,7 \pm 7,12%	1,9	0,52	15	0,4		

ALL: Akute Lymphatische Leukämie, BLM: Bleomycin, CPA: Cyclophosphamid, MTX: Methotrexat, MW: Mittelwert, NHL: Non-Hodgkin-Lymphom, n. s.: nicht signifikant, SD: Standardabweichung, VZ: Verdopplungszeit, YOB: Geburtsjahr. Zelllinien: 1) RoZd, 2) 96P0048, 3) 95P185, 4) PeAb, 5) JaCe, 6) 94P247, 7) 94P307

5 Diskussion

5.1 In-vitro Untersuchungen an Patientenzellen

Aus NBS-Patienten gewonnene primäre Lymphozyten und Fibroblasten lassen sich aufgrund ihres langsamen Wachstums erfahrungsgemäß schlecht kultivieren [Ranganathan et al., 2001]. Deshalb werden Untersuchungen zum NBS wie auch zur AT oft mit viral transformierten Zelllinien durchgeführt. Viele der bisher publizierten Ergebnisse zum zellulären Phänotyp beider Syndrome basieren auf Experimenten mit Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierten lymphoblastoiden Patientenzellen [Bebb et al., 2001; Gatei et al., 2000; Meijer et al., 1999; Shi et al., 2001]. Häufig findet sich in der Literatur auch die Verwendung von Simian-Virus (SV)40-transformierten Fibroblasten [Duchaud et al., 1996; Meyn et al., 1994]. Vorteile transformierter Zellen sind das stabile Wachstum und die unbegrenzte Verfügbarkeit. Auch in dieser Arbeit wurden EBV-transformierte B-Lymphozyten verwendet.

Kritisch zu betrachten sind jedoch Störfaktoren, die sich aus der viralen Transformation der Zellen ergeben. So führt die SV40-Transformation bei Fibroblasten zu einer Aneuploidie [Ramel et al., 1995]. EBV-transformierte Zellen behalten dagegen ihren diploiden Chromosomensatz, wodurch der Zellstoffwechsel insgesamt weniger beeinträchtigt wird [Tahara et al., 1997].

Auch die Expression bestimmter Gene kann durch das Einbringen viralen Genoms beeinflusst werden. Dabei kann auch die Apoptoseregulation betroffen sein. Eine gesteigerte Expression von anti-apoptotischem bcl-2 in EBV-transformierten Zellen kann so z. B. die Apoptoseinduktion stören [Bebb et al., 2001; Kawanishi, 1997]. Treten jedoch in Experimenten zur Apoptose Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenzellen mit gleichem Transformationsstatus auf, können diese nicht unmittelbar auf den Transformationsprozess zurückgeführt werden, so dass hier ein Klärungsbedarf besteht.

Weiterhin kann ein Zellmodell zwar Parallelen zur klinischen Situation der Patienten aufzeigen, allerdings nur in begrenztem Umfang. Das komplexe Zusammenspiel einzelner Systeme im Gesamtorganismus wird nicht erfasst. Dies gilt zwar auch für die vorliegende Arbeit, der Vorteil des hier verwendeten Zellmodells liegt jedoch darin, dass es sich bei dem verwendeten Zelltyp – aus NBS-Patienten isolierten B-Lymphozyten –

um unmittelbar am Krankheitsbild beteiligte Zellen handelt: Immundefizienz und B-Zell-Lymphome sind Hauptsymptome des NBS.

Insgesamt muss die Verwendung viral transformierter Zelllinien aufgrund der möglichen Beeinflussung des Zellstoffwechsels sowie des selektiven Untersuchungsmaterials kritisch betrachtet werden. Rückschlüsse vom zellulären auf den klinischen NBS-Phänotyp sollten daher zurückhaltend erfolgen. Auf eine mögliche Beeinflussung von EBV auf die in dieser Arbeit untersuchten zellulären Charakteristika wird in den jeweiligen Abschnitten der Ergebnisdiskussion im Einzelnen eingegangen.

5.2 Wachstum von NBS-Zellen

In den Wachstumsversuchen zeigten die NBS-Linien unterschiedliche Wachstumseigenschaften: Drei NBS-Linien wuchsen schneller, eine etwa gleich schnell und eine weitere Linie langsamer als die Kontrollzelllinien (vgl. Abb. 11). Andere Autoren fanden für NBS-Zellen meist ein im Vergleich zu Kontrollzellen reduziertes Wachstum [Girard et al., 2000; Kang et al., 2002; Tauchi et al., 2002], wobei auch variable Wachstumsraten beobachtet wurden [Ranganathan et al., 2001; Siwicki et al., 2003]. Zwei zelluläre Mechanismen spielen bei Untersuchungen zum Zellwachstum eine besondere Rolle: die Zellzykluskontrolle und die Telomerlänge.

Störungen der Zellzykluskontrolle in NBS-Zellen sind seit einiger Zeit bekannt [Demuth et al., 2004; Kang et al., 2002; Sullivan et al., 1997]. Im Zusammenhang mit langsamem Zellwachstum sind hier die Ergebnisse von KANG ET AL. interessant, die bei der Untersuchung des G1/S-Checkpoints in NBS-Mausfibroblasten eine erhöhte basale p21-Expression der Zellen fanden [Kang et al., 2002]. p21 wird durch p53 aktiviert und spielt eine wichtige Rolle im G1-Phasenarrest [el-Deiry et al., 1993]. Ein verzögerter Übertritt von Zellen von einer Phase des Zellzyklus in die nächste verlangsamt die Zellproliferation. Entsprechend wuchsen die von KANG ET AL. untersuchten NBS-Mausfibroblasten 2-5mal langsamer als Kontrollzellen. Dies könnte auch eine Erklärung für die reduzierte Proliferationsrate bei einer der hier untersuchten Zelllinien darstellen.

Bezüglich des Wachstumsverhaltens von NBS-Zellen stellt sich jedoch die Frage nach der in dieser Arbeit beobachteten großen Variabilität der Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Zelllinien.

Zum einen können Störungen in der Zellzykluskontrolle sowohl zu verminderten als auch zu gesteigerten Teilungsraten führen. Wiederholt wurden, konträr zu KANG ET AL., verminderte p53- und p21-Level in NBS-Zellen beschrieben [Antoccia et al., 1999; Jongmans et al., 1997; Matsuura et al., 1998]. Sowohl p53 als auch p21 sind wichtige Initiatoren des G1/S-Checkpoints. Bezüglich des G2-Arrests wurde in NBS-Zellen eine verminderte Phosphorylierung von Chk2, einem Schlüsselenzym im G2/M-Checkpoint, beobachtet [Buscemi et al., 2001].

Zum anderen spielt neben der Zellzykluskontrolle auch die Telomerlänge eine wichtige Rolle bei der Zellteilung. Telomere bilden die Enden der Chromosomen. Sie bestehen aus sich vielfach wiederholenden Nukleotidsequenzen (*Repeats*) und dienen dem Schutz der Chromosomenenden. Bei jeder Zellteilung werden Teile der Telomere 'verbraucht', die wieder ersetzt werden müssen. Dafür sorgt ein besonderes Enzym, die Telomerase, die durch reverse Transkription die DNA-Repeats immer wieder ersetzt. Ohne Telomeraseaktivität ist die Teilungsfähigkeit von Zellen begrenzt [Allsopp et al., 1992].

Neuere Studien sprechen für eine Beteiligung von Nibrin am Telomerstoffwechsel. Zusammen mit Mre11 und Rad50 konnte es in Telomeren humaner Wildtyp-Fibroblasten nachgewiesen werden [Lombard und Guarente, 2000]. RANGANATHAN ET AL. fanden verkürzte Telomere in primären NBS-Fibroblasten und brachten dies in Zusammenhang mit der schlechten Teilungsfähigkeit der Zellen. Wiedereinbringen des intakten Nbs1-Gens führte dabei zu einer Verlängerung der Telomere und zu einer Normalisierung des Zellwachstums [Ranganathan et al., 2001].

Demgegenüber konnten SIWICKI ET AL. keinen Telomerstoffwechsel-Defekt in NBS-Zellen nachweisen: Die untersuchten NBS-T-Lymphozyten zeigten ein kontinuierliches Wachstum, stabile Telomere und normale Telomeraseaktivität. Hieraus schlussfolgerten sie, dass *vollständiges, intaktes* Nibrin zur Erhaltung der Telomere in den Lymphozyten nicht notwendig sei [Siwicki et al., 2003]. Die Expression des von MASER ET AL. beschriebenen 70kDa-Proteinfragmentes [Maser et al., 2001], das sie in den untersuchten Zellen mittels Immunpräzipitation nachweisen konnten, reichte dabei aus, zusammen mit dem Mre11/Rad50-Komplex die Telomerstabilität zu gewährleisten. Dass das 70kDa-Fragment tatsächlich ausreicht, einige der vitalen Funktionen von Nibrin aufrecht zu erhalten, konnte erst vor kurzem erwiesen werden [Demuth et al.,

2004]. Eine mengenmäßig unterschiedlich starke Expression dieses Fragments könnte somit eine Erklärung für die hier gefundene Variabilität im Wachstumsverhalten darstellen.

Auch das von KANG und RANGANATHAN ET AL. gefundene langsame Zellwachstum [Kang et al., 2002; Ranganathan et al., 2001] ließe sich mit diesem Modell erklären – ihre Ergebnisse beruhen auf Experimenten mit Fibroblasten: In diesem Zelltyp konnte das 70kDa-Fragment bis heute nicht nachgewiesen werden.

Des Weiteren kommt für die Variabilität im Wachstumsverhalten die unterschiedliche genetische Ausstattung der Zellen mit einem verwobenen Netz verschiedener Genwirkungen in Frage. Zellzyklusanalysen, Untersuchungen zur Telomerstabilität, zur p53-Induktion sowie zur Expression der Proteinfragmente sind hier notwendig, um die Wachstumseigenschaften von NBS-Zellen besser zu verstehen.

Nicht zuletzt spielen Umweltfaktoren wie Kulturbedingungen und Nährstoffversorgung bei Untersuchungen zum Zellwachstum eine bedeutende Rolle. Ebenso beeinflusst der verwendete Zelltyp die Wachstumseigenschaften. Vor diesem Hintergrund bleibt zu berücksichtigen, dass in keiner der oben zitierten Arbeiten EBV-transformierte B-Lymphozyten verwendet wurden. Somit ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse anderer Autoren mit den hier ermittelten Wachstumsraten kritisch einzuschätzen.

5.3 Wachstumsinhibition von NBS-Zellen

Ein Hauptmerkmal von NBS-Patienten ist die ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit. Wie bereits erwähnt, kann die therapeutische Anwendung ionisierender Strahlung für die Patienten lebensbedrohlich sein (vgl. Abschnitt 1.3.1) [Distel et al., 2003]. Auch aus NBS-Patienten isolierte primäre und transformierte Zellen zeigen, verglichen mit Kontrollzellen, eine erhöhte Sterblichkeit nach Bestrahlung [van der Burgt et al., 1996]. Ionisierende Strahlen wirken über die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), und die zelluläre Hypersensitivität erstreckt sich auch auf DSB-produzierende Mutagene wie Bleomycin, Camptothecin, Mitomycin C, Etoposid oder Streptonigrin [Kraakman-van der Zwet et al., 1999; Meyn et al., 1994; Nakanishi et al., 2002; Nove et al., 1986]. Auf zytogenetischer Ebene steigt nach Bestrahlung die Frequenz von Chromosomenaberrationen in kultivierten NBS-Zellen im Vergleich zu normalen Zellen dramatisch [Antoccia et al., 1997; Antoccia et al., 1999; Taalman et al., 1983].

Ursache der gesteigerten Strahlenempfindlichkeit auf klinischer, zellulärer und zytogenetischer Ebene ist vermutlich eine gestörte Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche, an deren Erkennung und Reparatur Nibrin beteiligt ist [Kracker et al., 2005; Tauchi et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität von NBS-Zellen gegenüber den unterschiedlich wirkenden Zytostatika Bleomycin, Cyclophosphamid und Methotrexat getestet. Dabei wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des entsprechenden Zytostatikums inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die vitalen Zellen mit Hilfe eines automatischen Zählgerätes ausgezählt (vgl. Abschnitt 3.2).

Alle drei Stoffe vermochten in vitro ein Absterben der Zellen zu induzieren (vgl. Abschnitt 4.3). Auf Bleomycin reagierten NBS-Zellen verglichen mit gesunden Kontrollzellen in den Experimenten tendenziell empfindlicher, wobei ein signifikanter Unterschied nur bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml nachweisbar war (vgl. Abb. 12). Die erhöhte Sensitivität der Zellen könnte auf den Wirkmechanismus des Bleomycins zurückzuführen sein. Als Radiomimetikum gleicht sein Schadensspektrum dem ionisierender Strahlung, auf die NBS-Zellen besonders empfindlich reagieren [van der Burgt et al., 1996]. An der DNA induziert Bleomycin Doppelstrangbrüche, deren Erkennung und Reparatur bei NBS-Patienten gestört ist [Kracker et al., 2005; Tauchi et al., 2002].

Eine Erklärung für den in den hier durchgeführten Versuchen aufgetretenen verhältnismäßig *geringen* Unterschied in der Sensitivität zwischen NBS- und Kontrollzellen könnte in der hier verwendeten Methode liegen. Das automatische Zählgerät erfasst nur Zellen ab einer bestimmten, vorher festgelegten Größe. Diese Zellen werden als lebende Zellen gewertet. Allerdings ist die Größe ein relativ unspezifischer Parameter zur Beurteilung der Vitalität der Zelle. Zudem kann infolgedessen der Anteil toter Zellen nur indirekt geschätzt werden, was ein weiterer Nachteil der Methode ist.

Die Inkubation mit Methotrexat und Cyclophosphamid zeigte, im Gegensatz zur Inkubation mit Bleomycin, keinen Unterschied im Überleben von NBS- verglichen mit Kontrollzellen (vgl. Abschnitt 4.3). Dies könnte auf die Wirkmechanismen beider Stoffe zurückzuführen sein, die nicht auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen beruhen. Cyclophosphamid gehört zur Gruppe der bifunktionellen Alkylanzien, die ihre

Wirkung über eine Vernetzung von DNA-Strängen entfalten. NOVE ET AL. testeten die Sensitivität von NBS-Zellen gegenüber dem alkylierend wirkenden Agens MNNG (*N-methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidin*) und fanden ebenfalls keinen Unterschied in der Empfindlichkeit [Nove et al., 1986]. Allerdings handelt es sich bei MNNG um ein monofunktionelles Alkylanz, das nur einen DNA-Strang beschädigt. Die Wirkung von MNNG unterscheidet sich daher von der des Cyclophosphamids. Auch bei Methotrexat zeigte sich in den durchgeführten Versuchen kein Unterschied in der Empfindlichkeit. Als Folsäureantagonist wirkt es über die Hemmung der Dihydrofolatreduktase. Daraus resultiert eine gestörte DNA- und RNA-Synthese mit nachfolgendem Funktionsverlust und Zelltod.

Insgesamt zeigte sich eine erhöhte Empfindlichkeit von NBS-Zellen gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin. Diese Empfindlichkeit war bei Cyclophosphamid und Methotrexat, deren Wirkmechanismen nicht auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen beruhen, nicht nachweisbar.

5.4 Apoptoseinduktion in NBS-Zellen

5.4.1 Nachweisverfahren

In den letzten Jahren konnten, ermöglicht durch die charakteristischen Änderungen der Zellmorphologie während des Apoptoseprozesses, immer neue Verfahren zum Apoptosenachweis entwickelt werden.

Neben der konventionellen Mikroskopie und der DNA-Gelelektrophorese haben sich durchflusszytometrische Methoden mehr und mehr durchgesetzt, da sie schnell durchführbar, objektiv und sensitiv sind. In der Literatur finden sich am häufigsten der Apoptosenachweis nach NICOLETTI, die Annexin-V-Färbung sowie der TUNEL-Test. In dieser Arbeit wurden die NICOLETTI-Methode und die Annexin-V-Färbung angewandt. Die ebenfalls verwendete TUNEL-Methode konnte keine auswertbaren Ergebnisse liefern (vgl. Abschnitt 3.10). Jede der Methoden hat Vor- und Nachteile, die hier kurz aufgezeigt werden sollen.

Die *sub-G1-peak-Methode* nach NICOLETTI ist schnell und einfach durchführbar [Nicoletti et al., 1991]. Sie beruht auf dem, verglichen mit vitalen Zellkernen, geringeren DNA-Gehalt apoptotischer Zellkerne. Der geringere DNA-Gehalt führt zu einer verminderten Anfärbung apoptotischer Zellen mit Propidiumiodid (PI), was durchflusszytometrisch

nachgewiesen werden kann. Da der durch die Fragmentierung der DNA verursachte DNA-Verlust ein im Laufe des Apoptoseprozesses relativ spät auftretendes Ereignis ist, werden frühe Apoptosephasen nicht erfasst. Hiernach müssten mit dieser Methode ermittelte Apoptoseraten geringer sein als bei der Annexinfärbung, da diese auch frühe Apoptosephasen erfasst. Stattdessen fand sich aber bei gleichen Bleomycinkonzentrationen im NICOLETTI-Assay eine im Durchschnitt doppelt so hohe Apoptoserate verglichen mit der Annexin-V-Färbung (vgl. Abb. 18, Abb. 20). Die Ursache hierfür liegt in der geringeren Spezifität der NICOLETTI-Methode für den Apoptosenachweis. Der hypodiploide sub-G1-peak kann neben apoptotischen Zellkernen auch andere Strukturen wie Mikronuklei und Zellschutt beinhalten, die durch die künstlich induzierte Lyse der Zellmembran frei werden. Diesen Effekt beobachtet man insbesondere bei der Analyse unfixierter, durch Detergenzien lysierter Zellen, wie sie auch in diesem Projekt verwendet wurden. Zudem führt die Verwendung einer logarithmischen Skala zu einer Identifikation kleinster Objekte mit bis zu 0,1% der Fluoreszenz gesunder Zellen. Insgesamt führen die genannten Effekte zu einer Überschätzung der Apoptoserate [Darzynkiewicz et al., 1997]. Auch VERMES ET AL., die beide Methoden miteinander verglichen, fanden mit dem NICOLETTI-Assay höhere Raten und führten dies auf den Anteil mit erfasster, nicht-apoptosespezifischer Strukturen zurück [Vermes et al., 1995].

Spezifischer ist der Apoptosenachweis durch *Annexin-V-Färbung*, erstmals beschrieben von VERMES ET AL. [Vermes et al., 1995]. Phosphatidylserine translozieren zu einem frühen Zeitpunkt im Apoptoseprozess auf die Membranaußenseite und lassen sich durch Annexin-V markieren [van Engeland et al., 1998]. Durch FITC-Markierung des Annexins fluoreszieren Annexin-positive Zellen und können mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden. Dadurch werden schon frühe Apoptosestadien erfasst. Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid dient bei dieser Methode – im Gegensatz zur sub-G1-peak-Methode – lediglich dem Zweck, frühe von späten Apoptosephasen zu unterscheiden, da die Zellen erst PI einlagern, wenn die Zellmembran im Zuge des Absterbeprozesses löchrig geworden ist. Bei der sub-G₁-peak-Methode wird die Membran dagegen absichtlich in allen Zellen lysiert. Problematisch ist bei der Annexin-Methode allerdings die Abgrenzung spätapoptotischer von nekrotischen Zellen, da beide Prozesse mit einem Verlust der Zellmembranintegrität einhergehen können [Lizard et al., 1995]. Um keine durch

Apoptose zugrunde gegangenen Zellen zu versäumen, wurden bei der Versuchsauswertung PI-positive Zellen (PI+/Ax+) mit berücksichtigt. Dies beinhaltet andererseits die Gefahr zu hoch gemessener Apoptoseraten.

Aufgrund der beschriebenen Fehlermöglichkeiten der verschiedenen Nachweismethoden ist es ratsam, mehrere Methoden miteinander zu kombinieren, die auf unterschiedlichen Apoptosecharakteristika beruhen. Vergleicht man in unseren Experimenten die mit beiden Methoden ermittelten Apoptoseraten, so sind die absoluten Apoptoseraten bei der sub-G₁-peak-Methode wie bereits erwähnt deutlich höher als bei der Annexin-V-Färbung. Betrachtet man jedoch das relative Verhältnis der einzelnen Zelllinien zueinander erkennt man, dass dieses sich in beiden Versuchen relativ konstant widerspiegelt (vgl. Abb. 18, Abb. 20).

5.4.2 Apoptosefähigkeit von NBS-Zellen

Hauptteil dieser Arbeit war die Charakterisierung von NBS-Zellen hinsichtlich der Apoptosefähigkeit. Untersucht wurde die Apoptoseinduktion in lymphoblastoiden Zellen von sieben NBS-, zwei AT- und zwei Kontrollzelllinien nach Inkubation mit dem Radiomimetikum Bleomycin mit zwei unterschiedlichen Nachweismethoden. Zunächst werden die Ergebnisse der NBS-Zellen erörtert, die Diskussion der AT-Zell-Apoptose findet sich im Anschluss im Abschnitt 5.4.2.3.

Bei der Messung des relativen DNA-Gehalts mit der sub-G₁-peak-Methode zeigten drei der sieben NBS-Zelllinien bei beiden Bleomycinkonzentrationen durchgehend signifikant niedrigere Apoptoseraten als die Kontrollzellen (vgl. Abschnitt 4.4.2). Dieselben NBS-Zelllinien und zusätzlich eine weitere NBS-Linie wiesen auch im Annexin-V-Assay signifikant weniger Apoptose auf (vgl. Abschnitt 4.4.3). Die übrigen Zelllinien, darunter auch die AT-Zellen, zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Apoptoseindices der Kontrollzelllinien.

Die Frage der Apoptoseinduktion in NBS-Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die in den hier durchgeführten Experimenten aufgetretenen Variationen in der Höhe der Apoptoseindices mit einer Tendenz zur gestörten Apoptoseinduktion bei NBS-Zellen entsprechen den Ergebnissen aktueller Veröffentlichungen zu diesem Thema [Crompton et al., 2001; Rogoff et al., 2004]. Zwei Publikationen befassen sich mit virusinduzierter Apoptose in humanen NBS-Fibroblasten. Dabei waren die untersuchten NBS- und AT-Linien unfähig, die Apoptose zu induzieren [Powers et al.,

2004; Rogoff et al., 2004]. Zwar fanden sich keine Publikationen, die ausschließlich über die Apoptoseinduktion in NBS-B-Lymphozyten berichten, einige Autoren bezogen jedoch NBS-Lymphozyten in Untersuchungen zur AT mit ein. So fanden CROMPTON ET AL. analog zu den vorliegenden Ergebnissen eine reduzierte Apoptoserate primärer NBS-Lymphozyten nach Bestrahlung [Crompton et al., 2001]. Allerdings wurde nur eine Zelllinie untersucht. MEYN ET AL. fanden dagegen eine gesteigerte Streptonigrin-induzierte Apoptoserate in EBV-transformierten NBS-Zellen, wobei auch hier nur eine Zelllinie untersucht wurde [Meyn et al., 1994].

Zusammenfassend lassen die zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten in Zusammenhang mit den hier vorgestellten Ergebnissen einer reduzierten Apoptoserate bei vier von sieben NBS-Zelllinien eine Bedeutung von Nbs1 als Gatekeeper bei der Regulation und Induktion der Apoptose vermuten. Auf molekularer Ebene können Störungen der Apoptoseinduktion an der Krebsentstehung beteiligt sein [Igney und Krammer, 2002]. Möglicherweise könnte so ein Zusammenhang zum stark erhöhten Krebsrisiko des NBS hergestellt werden, einem der Hauptmerkmale des NBS-Phänotyps [Seemanova et al., 1985]. Es stellt sich die Frage, welcher Mechanismus Nbs1 mit der Apoptoseinduktion verknüpfen könnte.

5.4.2.1 *p53 und Apoptose*

Die Funktion des Bindeglieds zwischen Nbs1 und Apoptose könnte dem Tumorsuppressorgen p53 zukommen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Stabilität und insbesondere bei der Apoptoseinduktion [Vousden und Lu, 2002]. Nach einer DNA-Schädigung induziert p53 über einen G1/S-Phasenarrest eine Wachstumsverzögerung, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen [el-Deiry et al., 1993]. Eine mögliche Störung dieses Mechanismus in NBS-Zellen mit ihren potentiellen Auswirkungen auf das Zellwachstum wurde in Abschnitt 5.2 besprochen.

Ist die DNA-Schädigung jedoch irreparabel, kann p53 die Apoptose einleiten. Es besitzt somit eine klassische Gatekeeper-Funktion (vgl. Abb. 21).

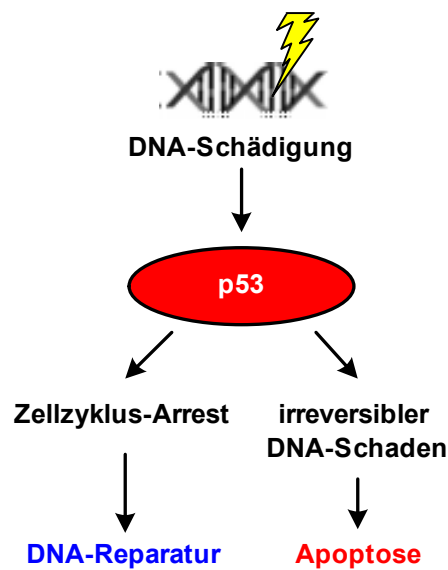
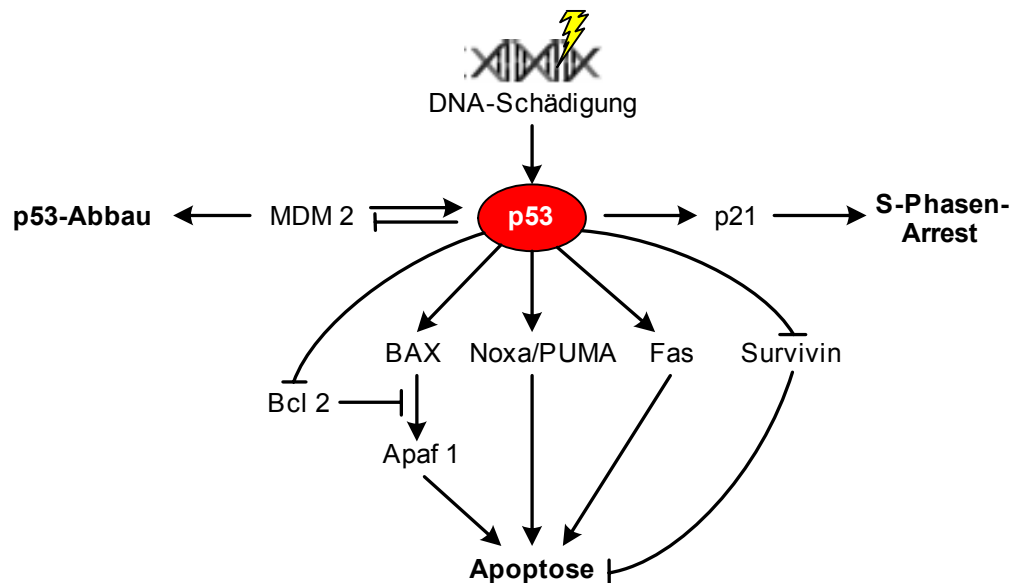


Abb. 21: Das Tumorsuppressorgen p53 induziert nach einer DNA-Schädigung in der Zelle entweder einen Zellzyklusarrest, um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen, oder es leitet, wenn der Schaden irreparabel ist, die Apoptose ein [Abb. modifiziert nach Hirao et al., 2002].

Wichtig für die Aktivierung von p53 sind multiple post-translationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen [Bode und Dong, 2004]. Unter physiologischen Bedingungen wird p53 im Falle einer DNA-Schädigung mehrfach phosphoryliert und somit stabilisiert und aktiviert [Giaccia und Kastan, 1998]. Die Phosphorylierungen modulieren die DNA-Bindekapazität von p53 und schützen es vor dem Abbau durch Proteasen. Aktiviertes p53 wirkt als Transkriptionsfaktor verschiedener Zielgene (u. a. *p21*, *Mdm2*, *GADD45*), die die breite p53-Antwort vermitteln [Zhao et al., 2000].

Durch Aktivierung einer Vielzahl apoptose-induzierender Gene spielt p53 eine Schlüsselrolle in verschiedenen, teilweise Zelltyp-spezifischen Apoptose-regulationswegen [Vousden und Lu, 2002]. So induziert p53 klassische Apoptosemoleküle wie BAX, FAS, PUMA und Noxa (vgl. Abb. 22) [Owen-Schaub et al., 1995; Vousden und Lu, 2002], die durch Permeabilisierung der Mitochondrienmembran weitere apoptotische Faktoren freisetzen. Auch durch Proteine der Zellmembran wie PERP, Fas und DR5 kann p53 die Apoptose induzieren [Attardi et al., 2000]. Außerdem wurde die p53-vermittelte Downregulation antiapoptotischer Gene wie *bcl-2* beschrieben [Zhou et al., 2002]. Neben diesen indirekten Mechanismen gibt es

Hinweise auf eine direkte Beteiligung von p53 an der Apoptoseinduktion durch direkte Translokation an die Mitochondrien [Mihara et al., 2003].



Apaf 1: Apoptotic protease activating factor, BAX: bcl-2-associated X Protein, bcl-2: B-Cell-Lymphoma 2, MDM 2: Mouse double minute 2 homolog, Noxa: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, PUMA: p53-upregulated modulator of Apoptosis

Abb. 22: Nach einer DNA-Schädigung wird p53 aktiviert. Daraufhin induziert es eine Vielzahl an Genen der Apoptoseregulation. Über p21 bewirkt es zudem einen Zellzyklusarrest [Abb. modifiziert nach Norbury und Zhivotovsky, 2004].

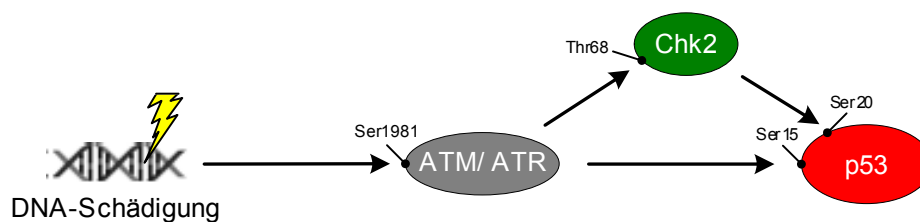
5.4.2.2 Nbs1 und p53

Intensiver als die Apoptosefähigkeit selbst wurde die p53-Regulation nach DNA-Schädigung in NBS-Zellen untersucht. Dabei liegen zum Anstieg der p53-Gesamtmenge in NBS-Zellen nach Bestrahlung widersprüchliche Ergebnisse vor. JONGMANS ET AL., die fünf NBS-Zelllinien untersuchten, beobachteten eine verzögerte und verminderte p53-Stabilisierung nach Bestrahlung [Jongmans et al., 1997]. Andere Gruppen bestätigten reduzierte p53-Level in NBS-Zellen, allerdings war der Effekt nicht so ausgeprägt wie bei AT-Zellen [Antoccia et al., 1999; Matsuura et al., 1998; Yamazaki et al., 1998]. Auch völlig normale p53-Level in unbehandelten [Siwicki et al., 2003] oder bestrahlten NBS-Zellen [Lim et al., 2000] sind beschrieben worden. Eine Zelllinie zeigte sogar eine stärkere p53-Akkumulation als die Kontrollzellen [Antoccia et al., 1999].

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von p53 nach DNA-Schädigung ist der p53-Gesamtgehalt in der Zelle jedoch ein relativ unspezifischer Parameter zur Beurteilung

einzelner p53-Effekte wie der Apoptoseinduktion. Aufschlußreicher sind hier neuere Untersuchungen mit pospho-spezifischen Antikörpern, die zur Aufklärung des genauen Phosphorylierungsmusters am p53-Protein nach DNA-Schädigung beitragen. Besonders bedeutend für die Einleitung der Apoptose scheint dabei die Phosphorylierung der Serinreste 15 und 20 zu sein [She et al., 2000; She et al., 2002].

Ein wichtiger Vermittler dieser Reaktionen ist das bei AT-Patienten mutierte ATM (Ataxia teleangiectasia mutated), einer Proteinkinase der Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen (PI3K). ATM spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion nach einer DNA-Schädigung, indem es zahlreiche – vorwiegend an der Zellzykluskontrolle beteiligte – Proteine phosphoryliert und somit aktiviert [Iliakis et al., 2003; Shiloh, 2003]. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von ATM bei der p53-Aktivierung gaben Untersuchungen, die eine verzögerte und verminderte strahlungsinduzierte p53-Stabilisierung in AT-Zellen nachwiesen [Antoccia et al., 1999; Khanna und Lavin, 1993; Lu und Lane, 1993]. Den biochemischen Zusammenhang lieferten spätere Publikationen, die die Phosphorylierung des Serinrests 15 an p53 durch ATM zeigen konnten [Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Khanna et al., 1998]. Neben der direkten p53-Phosphorylierung aktiviert ATM auch die Checkpoint-Kinase 2 (Chk2), welche über die Phosphorylierung an Serinrest 20 wiederum einer der stärksten Induktoren von p53 ist (vgl. Abb. 23) [Hirao et al., 2000; Matsuoka et al., 2000; Melchionna et al., 2000].



ATM: Ataxia teleangiectasia mutated, ATR: ATM and Rad3 related, Chk2: Checkpoint-Kinase 2, Ser: Serinrest, Thr: Threoninrest

Abb. 23: Nach einer DNA-Schädigung phosphoryliert ATM direkt oder indirekt über Chk2 p53 an den für die Apoptoseinduktion wichtigen Serinresten 15 und 20 [Abb. modifiziert nach Hirao et al., 2002].

Neben p53 konnte mittlerweile auch Nbs1 als wichtiger Reaktionspartner von ATM identifiziert werden: Nach Bestrahlung phosphoryliert ATM Nbs1 an wenigstens vier

Serinresten [Gatei et al., 2000; Lim et al., 2000; Wu et al., 2000; Zhao et al., 2000]. Zudem scheint Nbs1 die ATM-abhängige Phosphorylierung bestimmter Substrate zu erleichtern [Girard et al., 2002]. So konnten BUSCEMI ET AL. nachweisen, dass die durch ATM vermittelte Aktivierung der Chk2 funktionsfähiges Nbs1 benötigt [Buscemi et al., 2001]. Die Chk2 kann wiederum über Phosphorylierung von Serinrest 20 an p53 Apoptose induzieren [Hirao et al., 2000].

Für eine Beteiligung von Nbs1 an der Signaltransduktion zur Apoptose sprechen in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von ROGOFF ET AL. Nach E2F1-Stimulation, einem starken Induktor p53-abhängiger Apoptose [Pan et al., 1998], fanden sie in primären NBS-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen verminderte Apoptoseraten [Rogoff et al., 2004]. Bei normal ansteigenden p53-Gesamtmenen zeigten die NBS-Zellen eine unzureichende Phosphorylierung der Serinreste 15 und 20. Insbesondere die phospho-20-Form von p53 war in NBS-Zellen drastisch reduziert. Daraus schlossen ROGOFF ET AL., dass E2F1 zur effektiven Apoptoseinduktion funktionsfähiges Nibrin benötigt. Auch nach HPV-16-Stimulation war die Apoptoseinduktion in NBS-Zellen gestört [Rogoff et al., 2004]. POWERS ET AL. konnten in ähnlichen Experimenten ebenfalls eine reduzierte virusinduzierte Apoptose in NBS-Zellen nachweisen [Powers et al., 2004].

Aktuelle Publikationen sprechen dem Nbs1 zusätzlich eine wichtige Funktion in der Aktivierung der ATM-Kinase zu [Horejsi et al., 2004; Lee und Paull, 2004; Uziel et al., 2003]. In diesem Zusammenhang konnten LEE und PAULL kürzlich zeigen, dass der M/R/N-Komplex direkt an ATM bindet und daraufhin die Bindung von ATM an dessen Substrate Chk2 und p53 erheblich verstärkt wird. Handelte es sich beim eingesetzten Nibrin lediglich um das 70kDa-Fragment, konnte der Komplex nur noch schwach an ATM binden und die Bindung von ATM an Chk2 kaum beeinflussen [Lee und Paull, 2004].

Nbs1 scheint demnach Funktionen sowohl 'upstream' als auch 'downstream' von ATM zu besitzen und damit eine zentrale Rolle bei der Vermittlung ATM-abhängiger Signaltransduktionen zu spielen (vgl. Abb. 24).

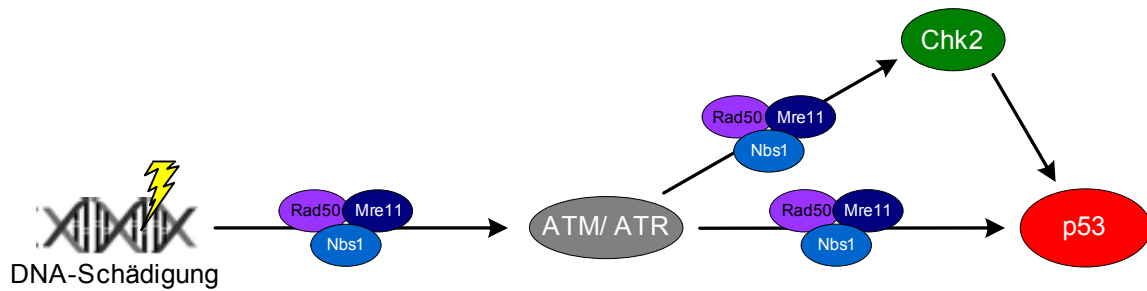


Abb. 24: Nbs1 spielt für eine Vielzahl ATM-vermittelter Signaltransduktionen nach DNA-Schädigung eine wichtige Rolle. Es erleichtert die ATM-abhängige Phosphorylierung von p53 und Chk2. Außerdem scheint es eine Funktion für die Aktivierung von ATM zu haben.

Nach aktuellen Ergebnissen scheint es neben ATM zudem weitere Kinasen zu geben, die Nbs1 mit p53 verknüpfen. ATR (ATM and Rad3-related-Kinase) ist strukturell mit dem ATM verwandt [Cimprich et al., 1996] und übernimmt ähnliche Funktionen in der Signaltransduktion nach DNA-Schädigung [Shiloh, 2001]. Wie das ATM ist es besonders wichtig für die Zellzykluskontrolle [Brown und Baltimore, 2003; Cliby et al., 1998]. Viele ATM-typische Substrate wie Chk1, Chk2 und p53 können ebenfalls durch ATR aktiviert werden [Abraham, 2001; Helt et al., 2005; Shiloh, 2001]. Hierzu gehört u. a. die Phosphorylierung des für die Apoptoseinduktion wichtigen Serinrests 15 an p53 [Lakin et al., 1999; Stiff et al., 2005; Tibbetts et al., 1999]. Auch Nbs1 wird durch ATR phosphoryliert [O'Driscoll et al., 2003]. STIFF ET AL. konnten kürzlich zeigen, dass wichtige ATR-vermittelte Phosphorylierungsschritte nach UV-Bestrahlung und Störung der Replikation durch Harnstoffgabe Nbs1-abhängig sind [Stiff et al., 2005]. Hierzu gehört auch die für die hier dargestellten Zusammenhänge wichtige Phosphorylierung von Serinrest 15 an p53, die in NBS-Zellen reduziert war. Dies könnte wiederum zu einer Störung der p53-abhängigen Apoptose führen.

Insgesamt betrachtet könnte die enge Kooperation von Nbs1 mit für die Apoptoseinduktion wichtigen Regulatoren wie ATM und ATR einen Zusammenhang zwischen Nbs1 und p53-vermittelter Apoptose herstellen. Die unzureichende Stabilisierung der p53-15- und 20-Phosphoformen wäre demnach eine mögliche Erklärung für die in den hier durchgeführten Versuchen festgestellte, signifikant verminderte Apoptoseinduktion in vier von sieben untersuchten NBS-Zelllinien.

Allerdings zeigten nicht alle untersuchten NBS-Zelllinien Störungen in der Apoptoseinduktion. Drei der untersuchten Zelllinien zeigten im Annexin-V-Assay keinen

signifikanten Unterschied zu den mittleren Apoptoseraten der Kontrollzellen (vgl. Abb. 20). Betrachtet man NBS-Zelllinien mit im Normalbereich liegender Apoptoseinduktion und solche mit im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant verminderten Apoptoseraten als zwei getrennte Populationen und berechnet den jeweiligen Mittelwert ergibt sich folgendes Bild:

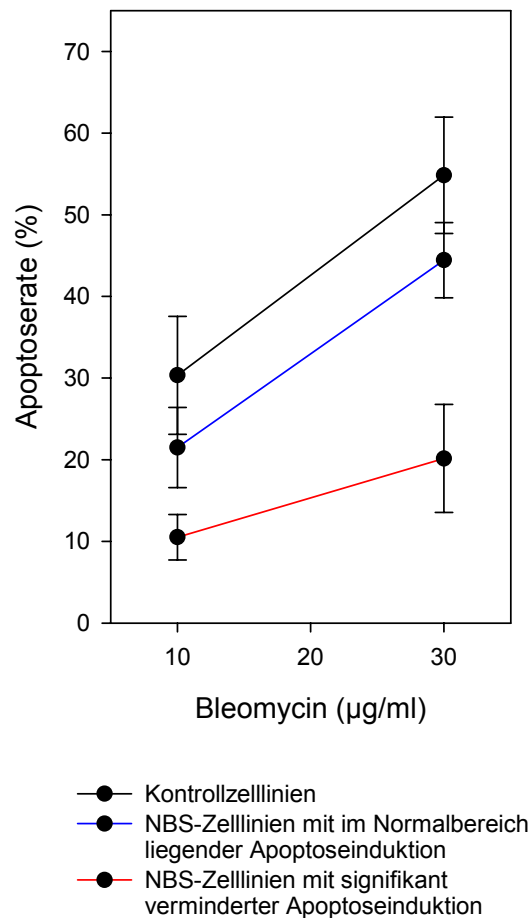


Abb. 25: Einteilung der NBS-Zelllinien nach ihren Apoptoseeigenschaften in zwei Gruppen: eine Gruppe mit tendenziell erniedrigter aber noch im Normalbereich liegender ($n = 3$), die zweite Gruppe mit signifikant verminderter Apoptoseinduktion ($n = 4$) nach Bleomycinbehandlung.

Zellen der Gruppe mit im Bereich der Kontrollzellen liegender Apoptoseinduktion (blau) zeigten zwar tendenziell verminderte Apoptoseraten, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. NBS-Zelllinien der zweiten Gruppe (rot) zeigten dagegen bei beiden Bleomycinkonzentrationen signifikant verminderte Apoptoseraten.

Nach der Erörterung möglicher Gründe für eine verminderte Apoptoseinduktion in NBS-Zellen (s. o.) bleibt damit zunächst die Frage offen, welche Ursachen es für die im Normalbereich liegenden Apoptoseraten bei drei der sieben untersuchten NBS-Zelllinien geben könnte.

Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wären die z. T. erheblichen Abweichungen, die einige Autoren bezüglich der p53-Induktion in NBS-Zellen untereinander fanden [Antoccia et al., 1999; Girard et al., 2000; Matsuura et al., 1998; Yamazaki et al., 1998]. Ebenso zeigen NBS-Patienten auf klinischer Ebene beträchtliche Variationen in der Ausprägung des Krankheitsbildes [The International Nijmegen-Breakage-Syndrome Study Group, 2000]. Möglicherweise reflektiert diese Variabilität verschiedene basale Expressionsmuster im großen Netzwerk pro- und antiapoptotischer Gene. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass in den drei Zelllinien mit normaler Apoptosefähigkeit andere Proteine stärker exprimiert werden, die die gestörte Nbs1-Funktion kompensieren. Betrachtet man die Abbildungen 5 und 23 unter diesem Gesichtspunkt, wird deutlich, dass es sich bei der Regulation der Apoptose um ein komplexes Netzwerk ineinandergreifender Genwirkungen handelt. So könnte eine gesteigerte Expression pro-apoptotischer Faktoren wie BAX, Noxa oder PUMA einer mangelnden p53-Aktivierung entgegenwirken. Auch von p53 gänzlich unabhängige Apoptoseregulationswege sind beschrieben worden (vgl. Abb. 5) [Li et al., 2000; Yang et al., 2002].

NBS-Patienten mit solchen Veränderungen im zellulären Expressionsmuster wären so in der Lage, trotz fehlender Nibrinfunktion auf eine DNA-Schädigung adäquat zu reagieren und das Apoptoseprogramm auszulösen. Demzufolge bestünde bei diesen Patienten auch ein geringeres Risiko zur Anhäufung von Mutationen und nachfolgender maligner Entartung.

Ein solcher Zusammenhang könnte sich unter Miteinbeziehung der klinischen Daten zur Krebsentstehung in Korrelation mit den hier gefundenen Apoptoseraten andeuten: Zwei von drei Patienten aus der Gruppe mit im Normalbereich liegender Apoptosefähigkeit haben bisher noch kein Malignom entwickelt. Beim Malignom der dritten Patientin handelt es sich mit einem Meningeom um einen benignen, NBS-untypischen Hirntumor. Alle vier Patienten, deren Lymphoblasten verminderte Apoptoseraten aufwiesen, haben dagegen bereits Lymphome entwickelt (vgl. Tab. 4).

Es wäre also möglich, dass es generell zwei Gruppen von NBS-Patienten gibt – Patienten mit höherem und mit niedrigerem Entartungsrisiko, wobei eine verminderte Apoptoseinduktion als Risikofaktor für Krebs angesehen werden könnte. Aufgrund der niedrigen hier untersuchten Gesamtfallzahl sollten sich jedoch in jedem Fall Studien mit größeren Patientenzahlen anschließen, um genauere Erkenntnisse über den Zusammenhang von Apoptosefähigkeit und Krebsentstehung bei NBS-Patienten zu gewinnen.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die Variationen auf klinischer und zellulärer Ebene könnte die variable Expression eines Proteinfragments mit teilweise erhaltener Restfunktion liefern, das MASER ET AL. vor kurzem nachweisen konnten [Maser et al., 2001]. Auch GIRARD ET AL. schlugen eine variable Restfunktion als Erklärung für interzelluläre Schwankungen vor; zu diesem Zeitpunkt war das Proteinfragment allerdings noch nicht entdeckt worden [Girard et al., 2000]. Vorstellbar ist ein Zusammenhang der Restfunktion mit p53-abhängiger Apoptose. Das 70kDa-Fragment könnte, unterschiedlich stark exprimiert, indirekt z. B. über ATM, die Phosphorylierung von p53 an den Serinresten 15 und 20 erleichtern und dadurch Apoptose ermöglichen. Dass das 70kDa-Fragment tatsächlich ausreicht, um einige Nibrinfunktionen aufrecht zu erhalten, konnte kürzlich bewiesen werden [Demuth et al., 2004].

5.4.2.3 *AT und Apoptose*

Das Nijmegen-Breakage-Syndrom zeigt auf klinischer und zellulärer Ebene vielfach Überschneidungen mit der Ataxia teleangiectasia (vgl. Tab. 1). Beide Syndrome gehen mit erhöhter Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, Immundefizienz, radioresistenter DNA-Synthese, Zellzyklusdefekten und erhöhtem Krebsrisiko einher [Crawford, 1998; Seemanova et al., 1985; Taalman et al., 1983]. Ergänzend zu den sieben NBS-Zelllinien wurden aufgrund der Überschneidungen im zellulären Phänotyp zusätzlich zwei AT-Zelllinien in Bezug auf die Apoptoseinduktion nach Bleomycinbehandlung untersucht. Dabei zeigte sich mit beiden Nachweismethoden eine im Bereich der Kontrollzellen liegende Apoptoserate der AT-Lymphoblasten (vgl. Abb. 18, Abb. 20).

Die große Bedeutung von ATM in der Zellantwort auf DNA-Schädigungen sowie seine enge Kooperation mit p53 und Nbs1 (vgl. Abschnitt 5.4.2.2) lässt zunächst eine mangelnde Apoptoseinduktion in AT-Zellen vermuten. Die Literatur liefert hier

widersprüchliche Daten. Zwar gibt es zahlreiche Berichte, die tatsächlich eine gestörte Apoptoseregulation im Sinne einer verminderten Apoptoserate nach Bestrahlung von AT-Zellen dokumentieren [Bebb et al., 2001; Crompton et al., 2001; Duchaud et al., 1996; Meijer et al., 1999; Shigeta et al., 1999]. Andere Arbeitsgruppen berichten dagegen von gesteigerten Apoptoseindices [Humar et al., 1997; Meyn et al., 1994; Shi et al., 2001; Zhang et al., 2001]. Auch eine normale, im Bereich gesunder Kontrollzellen liegende Apoptoseinduktion nach Bestrahlung lymphoblastoider AT-Zellen wurde beobachtet [Fernet et al., 2003; Meijer et al., 2001].

Welche Erklärung könnte es – trotz der engen Verknüpfung von ATM zu Proteinen der Apoptoseregulation – für die dennoch immer wieder dokumentierte normale oder gar verstärkte Apoptoseinduktion in AT-Zellen geben?

Eine Möglichkeit ist die Existenz alternativer Regulationswege in der Signaltransduktion zu p53. Andere Mitglieder der PI3K-Familie könnten den ATM-Ausfall kompensieren. Potenzieller Kandidat für diese Rolle ist das bereits erwähnte ATR (ATM and Rad3-related-Protein) (vgl. Abschnitt 5.4.2.2), dessen Funktionen sich vielfach mit denen des ATM überschneiden [Abraham, 2001; Helt et al., 2005; O'Driscoll et al., 2003; Shiloh, 2001]. Hierzu gehört auch die Phosphorylierung des für die Apoptoseinduktion essentiellen Serinrests 15 an p53 [Lakin et al., 1999; Stiff et al., 2005; Tibbetts et al., 1999]. Auch Nbs1 wird von ATR phosphoryliert [O'Driscoll et al., 2003]. Denkbar ist demnach, dass der Ausfall einer der beiden Kinasen durch den Ersatz der anderen kompensiert werden kann. ABRAHAM schlägt hierzu folgendes Modell vor: Beim Fehlen von intaktem ATM (AT-Patienten) oder in normalen Zellen mit hohen Leveln bestrahlungsinduzierter DNA-Schäden könnte ATR – evtl. mit einiger Verzögerung – als 'Ersatz'-Kinase einspringen [Abraham, 2001]. Es wäre also denkbar, dass ATR Defizite der AT-Zellen zur Induktion der Apoptose ausgleichen und so eine normale Apoptoseinduktion, wie sie auch in den hier durchgeführten Experimenten zu beobachten war (vgl. Abschnitte 4.4.2 und 4.4.3), aufrechterhalten könnte. Der Ausfall von Nibrin würde also *zwei* Wege der Apoptoseinduktion betreffen, der Ausfall von ATM dagegen nur einen. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die höhere Tumorzinzidenz bei NBS- verglichen mit AT-Patienten dar [Seemanova et al., 1985; Taylor et al., 1996].

Eine weitere Ursache einer normalen Apoptoseregulation in AT-Zellen könnte wiederum die p53-unabhängige Apoptose sein, die durch Proteine wie Nur77 oder p73 vermittelt

wird (vgl. Abb. 5). Ein solches Modell wurde bereits bei den Überlegungen zur normalen Apoptoseinduktion in NBS-Zellen diskutiert (vgl. Abschnitt 5.4.2.2). Auch bei der AT könnten unterschiedlich stark exprimierte Apoptoseregulations-Proteine den ATM-Verlust kompensieren.

Zur Erhärtung dieser Thesen sind, besonders im Hinblick auf die kleine Zahl von zwei untersuchten AT-Zelllinien, sicherlich weiterführende Untersuchungen notwendig. Sind jedoch in den letzten Jahren mehr und mehr Überschneidungen von NBS und AT auf molekularer Ebene gefunden worden, bleibt doch festzuhalten, dass es sich um unterschiedliche Krankheitsbilder handelt. Bei der AT fehlen Mikrozephalie, charakteristische Facies und Entwicklungsverzögerung, beim NBS hingegen die Ataxie. Möglicherweise handelt es sich also bei der Apoptosefähigkeit um ein weiteres Merkmal, in dem sich beide Syndrome voneinander unterscheiden.

5.4.2.4 Methodik bei Untersuchungen zur Apoptose

Unabhängig vom zugrunde liegenden Syndrom sollte bei der Diskussion der vorliegenden Ergebnisse weiterhin berücksichtigt werden, dass bei Untersuchungen zur Apoptose die Methodik eine wichtige Rolle spielt. Induktions- und Nachweismethode, Erfassungszeitraum und Zelltyp variieren in den Veröffentlichungen beträchtlich [z. B. Bebb et al., 2001; Meyn et al., 1994; Rogoff et al., 2004; Shi et al., 2001].

Beim Vergleich mit den hier vorliegenden Ergebnissen liegt ein Unterschied darin, dass in der Literatur vornehmlich ionisierende Strahlung, hier dagegen chemische Mutagene verwendet wurden. Allerdings gibt es Untersuchungen, in denen NBS-Zellen genauso empfindlich auf das hier verwendete Radiomimetikum Bleomycin wie auf ionisierende Strahlung reagieren [Perez-Vera et al., 1997].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Zeitintervall zwischen Induktion der Apoptose und Messung der Apoptoseraten. Diese Zeiträume reichen in der Literatur von einigen wenigen Stunden bis zu mehreren Wochen. SHI ET AL. berücksichtigten das langsamere Wachstum von AT-Zellen und erfassten die Apoptose noch bis zu 30 Tage nach Bestrahlung. Dabei fanden sie im Vergleich zu Kontrollzellen gesteigerte Apoptoseraten [Shi et al., 2001]. Außerdem kann der Zeitpunkt der Apoptose leicht verpasst werden, da der Prozess, sobald er einmal ausgelöst wurde, sehr schnell durchlaufen wird. So kann die gemessene Rate trotz ausgedehnter Apoptose gering sein [Wyllie et al., 1980]. Um diese Fehlerquellen zu vermeiden wurden in dieser Arbeit Versuche zum genauen

zeitlichen Verlauf der Apoptose nach DNA-Schädigung durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.4.1).

Weiterhin können die verschiedenen Nachweismethoden zum Teil stark divergierende Apoptoseindices liefern (vgl. Abschnitt 5.4.1). BEBB ET AL. fanden z. B. mit der TUNEL-Methode zwei- bis dreifach höhere Apoptoseraten als mit der sub-G₁-peak-Methode [Bebb et al., 2001]. Auch in den hier durchgeführten Versuchen variierten die Raten zwischen beiden Nachweismethoden zum Teil erheblich (vgl. Abschnitte 4.4.2 und 4.4.3).

Auch der verwendete Zelltyp kann Messungen der Apoptoseraten beeinflussen. In der Literatur wird die Verwendung humaner Fibroblasten und Lymphozyten, Maus- oder Hühnerzellen beschrieben, die sich in ihrer Apoptoseregulation erheblich unterscheiden können. So ist die Apoptose in Lymphozyten generell leichter zu induzieren als in Fibroblasten. Zudem ist bekannt, dass periphere Lymphozyten ohne jeglichen Stimulus eine spontane Apoptoserate von bis zu 20% besitzen können [Genzlinger, 1997]. Einige Forschungsgruppen arbeiteten mit transformierten, andere mit primären Zelllinien. Dabei muss eine mögliche Beeinflussung der Apoptose durch den Prozess der Virustransformation berücksichtigt werden (vgl. Abschnitt 5.1). So kann die EBV-Transformation zur Heraufregulation des antiapoptotischen bcl-2 führen und dadurch die Apoptose unterdrücken (vgl. Abschnitt 5.1) [Kawanishi, 1997]. VIDAIR ET AL. führten die gesteigerte Apoptoseneigung SV40-transformierter AT-Fibroblasten auf eine erhöhte c-myc-Expression zurück [Vidair et al., 1996]. Es existieren aber auch Veröffentlichungen, die die Unabhängigkeit der Apoptoserate von der Virustransformation herausstellen. DUCHAUD ET AL. verglichen die Apoptoserate EBV-transformierter mit der nicht-transformierter AT-Zellen nach Bestrahlung und konnten keinen Unterschied feststellen. Auch die spontane Apoptoserate war unabhängig vom Transformationsstatus [Duchaud et al., 1996]. Auch SHI ET AL. konnten keinen Unterschied in der Apoptoserate zwischen transformierten und nativen AT-Lymphozyten feststellen [Shi et al., 2001].

Zusammenfassend liefern die in dieser Arbeit erhobenen Daten keinen Hinweis darauf, dass der erhöhten Radio- und Zytostatikasensitivität von NBS-Zellen eine durch genomische Instabilität ausgelöste gesteigerte Apoptose zugrunde liegt. Vielmehr scheint die komplexe Induktion, zumindest in einigen dieser Zelllinien, gestört zu sein.

Um ein differenzierteres Bild der Apoptoseregulation in NBS-Zellen zu gewinnen, sind hier weiterführende Untersuchungen erforderlich, insbesondere zur p53-Expression und seinem genauen Phosphorylierungsmuster sowie zur Expression anderer, apoptoseregulierender Gene.

5.5 Die Rolle von Nbs1

Nach dem bereits in der Einleitung beschriebenen Modell von KINZLER und VOGELSTEIN spielen zwei Gruppen von Genen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung [Kinzler und Vogelstein, 1997]. Die Caretaker sind für die Instandhaltung des Genoms durch Reparatur entstandener DNA-Läsionen zuständig. Die Gatekeeper kontrollieren dagegen den Zellzyklus und die Apoptose und verhindern so die Weitergabe fehlerhafter Informationen an Tochterzellen. Mutationen in Genen beider Gruppen können zu genetischer Instabilität und verminderter Apoptosefähigkeit führen, in deren Folge es zur Entartung der Zelle kommen kann.

Unternimmt man den Versuch, Nbs1 im komplexen Netzwerk der Reaktionen der Zelle auf eine DNA-Schädigung einzuordnen, ergibt sich folgendes Bild: Als Caretaker spielt es bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle. Dabei kann eine Funktion des Nibrins beim Reparaturmechanismus des NHEJ als gesichert, bei der homologen Rekombination als wahrscheinlich angesehen werden [Kracker et al., 2005; Tauchi et al., 2002]. In der Zellzykluskontrolle übernimmt Nbs1 zudem Gatekeeper-Funktionen. Eine Beteiligung am intra-S-Phase-Checkpoint ist mehrfach belegt worden [Gatei et al., 2000; Lim et al., 2000]. Auch der G2/M-Checkpoint zeigte sich in vielen Veröffentlichungen in NBS-Zellen gestört [Demuth et al., 2004; Stiff et al., 2004].

Mit der Apoptoseregulation wurde in dieser Arbeit ein weiterer, wichtiger Gatekeeper-Mechanismus untersucht. Dabei zeigten vier von sieben NBS-Zelllinien Störungen in der Apoptosefähigkeit, was eine Funktion von Nbs1 bei der Apoptoseregulation wahrscheinlich macht. Nbs1 scheint also sowohl Caretaker- als auch Gatekeeper-Funktionen zu übernehmen.

Insgesamt scheint eine strikte Trennung von Caretakers und Gatekeepers nicht immer möglich. Vielmehr muss bisweilen von einem komplexen Zusammenspiel der Regulatoren und Effektoren beider 'pathways' ausgegangen werden. Einige Proteine, die sowohl an der Erkennung von DNA-Schäden und deren Reparatur als auch an der Apoptoseregulation beteiligt sind, wurden bereits beschrieben [Cregan et al., 2002].

Mutationen in solchen Genen, die Caretaker und Gatekeeper in einem sind, müssten folglich besonders schwere klinische Konsequenzen in Gestalt eines stark erhöhten Krebsrisikos mit sich bringen. Vergleicht man das klinische Bild des NBS mit Krankheiten wie der Xeroderma pigmentosum [Stary und Sarasin, 2002] oder dem Li-Fraumeni-Syndrom [Li und Fraumeni, 1969], bei denen nur entweder Caretaker- oder Gatekeeper-Gen betroffen sind, fällt das schon besonders früh stark erhöhte Krebsrisiko auf [Seemanova et al., 1985]. Auf dieser Grundlage erscheint eine Doppelfunktion des Gens ebenfalls plausibel. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang auch das hier gefundene gemeinsame Auftreten reduzierter Apoptoseindices zusammen mit Lymphomen. Patienten mit einer gestörten Apoptoseinduktion erkrankten dabei bisher sämtlich an malignen Lymphomen, während Patienten mit im Normalbereich liegender Apoptosefähigkeit bislang keine Lymphome entwickelten (vgl. Tab. 4).

Möglicherweise führt also die DNA-Reparatur-Störung der NBS-Zellen erst bei gleichzeitig herabgesetzter Apoptoseinduktion zu einem erhöhten Krebsrisiko. Patienten, die trotz Nbs1-Mutation und dank kompensierender Veränderungen in der Expression anderer Gene eine effektive Apoptose aufrechterhalten können, wären weniger gefährdet. Hieraus folgt auch, dass die Gemeinsamkeiten beider Patientengruppen – Immundefizienz und Zellzyklusstörungen – vermutlich allein durch die Störungen in der DNA-Reparatur bedingt werden. Tatsächlich konnte eine direkte Beteiligung von Nibrin am Immunglobulin-Klassenwechsel in B-Lymphozyten, einem NHEJ-Mechanismus, erst vor kurzem gezeigt werden [Kracker et al., 2005]. Hierdurch wird, durch die Funktion von Nibrin im NHEJ, zum ersten Mal eine molekulare Erklärung für die Immundefizienz der NBS-Patienten gegeben.

6 Zusammenfassung

Das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) ist ein seltenes, autosomal rezessiv vererbtes Chromosomenbruchsyndrom. Betroffene Patienten zeigen eine typische kraniofaziale Dysmorphie, Mikrozephalie, Minderwuchs und Immundefizienz. Das Krebsrisiko ist bei NBS-Patienten stark erhöht, wobei insbesondere Lymphome gehäuft auftreten.

Nach einem Modell von KINZLER und VOGELSTEIN spielen zwei Gruppen von Genen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung, die Caretaker und die Gatekeeper. Während Caretaker für die Reparatur von DNA-Schäden zuständig sind, kontrollieren Gatekeeper den Zellzyklus und die Induktion der Apoptose. Mutationen in Genen beider Gruppen können zu genetischer Instabilität und verminderter Apoptosefähigkeit führen, in deren Folge die Zelle entarten kann.

Die dem NBS in über 90% der Fälle zugrunde liegende Mutation, eine 5bp-Deletion im Nbs1-Gen, konnte 1998 identifiziert werden. Die Funktionen des betroffenen Genprodukts, dem Nibrin, sind jedoch noch nicht vollständig erschlossen. Gesichert scheint bisher eine Funktion von Nibrin als Caretaker bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. In der Zellzykluskontrolle übernimmt Nibrin zudem Gatekeeper-Funktionen. Ziel dieser Arbeit war es, mit der Apoptoseinduktion einen zweiten, wichtigen Gatekeeper-Mechanismus zu untersuchen. Aufgrund der klinischen und zellulären Überschneidungen im Phänotyp von NBS mit der Ataxia teleangiectasia (AT) wurden zwei AT-Zelllinien in die Untersuchungen einbezogen.

Als Untersuchungsmaterial dienten lymphoblastoide Zelllinien von sieben NBS- und zwei AT-Patienten sowie zwei Kontrollzelllinien. Mit der Technik der Durchflusszytometrie wurden die Apoptoseraten der Zelllinien nach Induktion einer DNA-Schädigung durch das Radiomimetikum Bleomycin bestimmt. Als zwei voneinander unabhängige Apoptose-Nachweismethoden wurden die sub-G1-peak-Methode und die Annexin-V-Färbung verwendet. Zunächst mussten Standardbedingungen für die Messungen der Apoptoseraten festgelegt werden. Hierzu wurden Untersuchungen zum Zellwachstum, zur Wachstumsinhibition sowie durchflusszytometrische Versuche zum zeitlichen Verlauf der Apoptose und zur Induktion bei unterschiedlichen Mutagenkonzentrationen durchgeführt.

Die mit der sub-G1-peak-Methode ermittelten Apoptoseraten lagen insgesamt höher als mit der Annexinfärbung gemessene Raten. Dies könnte auf der geringeren Spezifität der sub-G1-peak-Methode beruhen, bei der in die Messung eingehende Zelltrümmer häufig zu einer Überschätzung der Apoptoserate führen.

Für die Auswertung wurden die Apoptoseraten der Patientenzellen mit denen der Kontrollzelllinien verglichen. Bei der Messung mit der sub-G₁-peak-Methode zeigten drei der sieben NBS-Zelllinien bei beiden Bleomycinkonzentrationen signifikant niedrigere Apoptoseraten als die Kontrollzellen. Diese drei NBS-Zelllinien sowie eine weitere NBS-Linie wiesen auch bei der Untersuchung mit dem spezifischeren Annexin-V-Assay eine signifikant nach unten abweichende Apoptoserate auf. Die übrigen Zelllinien, darunter auch die AT-Zellen, zeigten Apoptoseindices im Bereich der Kontrollzell-Messwerte.

Der Befund der reduzierten Apoptoseraten bei vier der sieben untersuchten NBS-Zelllinien weist darauf hin, dass das Nbs1-Gen neben der bereits etablierten Rolle in der DNA-Reparatur auch bei der Signalvermittlung zu Regulatoren der Apoptose eine Rolle spielen könnte. Mögliches Bindeglied zwischen Nbs1 und der Apoptoseinduktion könnte dabei das Tumorsuppressorgen p53 darstellen, das einer der stärksten Apoptoseinduktoren ist. Die verzögerte und verminderte Stabilisierung von p53 in NBS-Zellen wurde bereits beschrieben. Aktuelle Studien konnten zudem in NBS-Zellen eine reduzierte Phosphorylierung der Serinreste 15 und 20 an p53 zeigen, die eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion spielen.

Bei Nbs1 könnte es sich demnach um ein Gen handeln, das nach dem Modell von KINZLER und VOGELSTEIN sowohl Caretaker- als auch Gatekeeper-Funktionen besitzt. Mutationen in solchen Genen, die Caretaker und Gatekeeper in einem sind, müssten folglich besonders schwere klinische Konsequenzen mit sich bringen. Vergleicht man das klinische Bild des NBS mit Krankheiten, bei denen nur entweder Caretaker- oder Gatekeeper-Gen betroffen sind, fällt das schon besonders früh stark erhöhte Krebsrisiko auf. Auf dieser Grundlage erscheint eine Doppelfunktion des Gens ebenfalls wahrscheinlich.

Andererseits zeigten drei der NBS-Zelllinien keinen signifikanten Unterschied zu den mittleren Apoptoseraten der Kontrollzellen. In diesen Variationen zwischen einzelnen Zelllinien könnte sich der individuelle genetische Hintergrund der Zellen zeigen, der

auch zur erheblichen klinischen Variabilität des Krankheitsbildes beiträgt. Diese Variabilität zeigte sich ebenfalls bei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zur Mutagensensitivität lymphoblastoider NBS-Zellen.

Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang das gemeinsame Auftreten niedriger Apoptoseraten mit malignen Lymphomen: Alle Patienten, deren lymphoblastoide Zellen Störungen in der Apoptoseinduktion aufwiesen, erkrankten bisher an Lymphomen, während Patienten, deren Zellen im Normalbereich liegende Apoptoseraten zeigten, bislang keine Lymphome entwickelten. Möglicherweise gibt es also generell zwei Gruppen von NBS-Patienten – Patienten mit höherem und mit niedrigerem Entartungsrisiko, wobei eine verminderte Apoptoseinduktion als Risikofaktor für Krebs angesehen werden könnte.

Die Charakterisierung von NBS-Zellen hinsichtlich der Fähigkeit, nach einer DNA-Schädigung die Apoptose zu induzieren, könnte sich zukünftig als wertvoll für die Entschlüsselung von Faktoren erweisen, die zur klinischen Variabilität des Krankheitsbildes – insbesondere bezüglich des Auftretens von Krebserkrankungen – beitragen.

Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. (2001): Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 17, Seite 2177-96.
- Adams, J. M. und Cory, S. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* (Band 281), Nr. 5381, Seite 1322-6.
- Allsopp, R. C.; Vaziri, H.; Patterson, C.; Goldstein, S.; Younglai, E. V.; Fletcher, A. B.; Greider, C. W. und Harley, C. B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 21, Seite 10114-8.
- Anderson, D. E.; Trujillo, K. M.; Sung, P. und Erickson, H. P. (2001): Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 40, Seite 37027-33.
- Antoccia, A.; Ricordy, R.; Maraschio, P.; Prudente, S. und Tanzarella, C. (1997): Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines, *Int J Radiat Biol* (Band 71), Nr. 1, Seite 41-9.
- Antoccia, A.; Stumm, M.; Saar, K.; Ricordy, R.; Maraschio, P. und Tanzarella, C. (1999): Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines, *Int J Radiat Biol* (Band 75), Nr. 5, Seite 583-91.
- Ashkenazi, A. und Dixit, V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation, *Science* (Band 281), Nr. 5381, Seite 1305-8.
- Attardi, L. D.; Reczek, E. E.; Cosmas, C.; Demicco, E. G.; McCurrach, M. E.; Lowe, S. W. und Jacks, T. (2000): PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 6, Seite 704-18.
- Banin, S.; Moyal, L.; Shieh, S.; Taya, Y.; Anderson, C. W.; Chessa, L.; Smorodinsky, N. I.; Prives, C.; Reiss, Y.; Shiloh, Y. und Ziv, Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage, *Science* (Band 281), Nr. 5383, Seite 1674-7.
- Bebb, D. G.; Warrington, P. J.; de Jong, G.; Yu, Z.; Moffat, J. A.; Skov, K.; Spacey, S.; Gelmon, K. und Glickman, B. W. (2001): Radiation induced apoptosis in ataxia telangiectasia homozygote, heterozygote and normal cells, *Mutat Res* (Band 476), Nr. 1-2, Seite 13-20.
- Bekiesinska-Figatowska, M.; Chrzanowska, K. H.; Sikorska, J.; Walecki, J.; Krajewska-Walasek, M.; Jozwiak, S. und Kleijer, W. J. (2000): Cranial MRI in the Nijmegen breakage syndrome, *Neuroradiology* (Band 42), Nr. 1, Seite 43-7.

- Blocher, D. und Pohlitz, W. (1982): DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of x-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks?, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* (Band 42), Nr. 3, Seite 329-38.
- Bode, A. M. und Dong, Z. (2004): Post-translational modification of p53 in tumorigenesis, *Nat Rev Cancer* (Band 4), Nr. 10, Seite 793-805.
- Brown, E. J. und Baltimore, D. (2003): Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance, *Genes Dev* (Band 17), Nr. 5, Seite 615-28.
- Buscemi, G.; Savio, C.; Zannini, L.; Micciche, F.; Masnada, D.; Nakanishi, M.; Tauchi, H.; Komatsu, K.; Mizutani, S.; Khanna, K.; Chen, P.; Concannon, P.; Chessa, L. und Delia, D. (2001): Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage, *Mol Cell Biol* (Band 21), Nr. 15, Seite 5214-22.
- Cadet, J.; Douki, T.; Gasparutto, D. und Ravanat, J. L. (2003): Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat Res* (Band 531), Nr. 1-2, Seite 5-23.
- Cain, K.; Brown, D. G.; Langlais, C. und Cohen, G. M. (1999): Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 32, Seite 22686-92.
- Canman, C. E.; Lim, D. S.; Cimprich, K. A.; Taya, Y.; Tamai, K.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Kastan, M. B. und Siliciano, J. D. (1998): Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53, *Science* (Band 281), Nr. 5383, Seite 1677-9.
- Carney, J. P.; Maser, R. S.; Olivares, H.; Davis, E. M.; Le Beau, M.; Yates, J. R., 3rd; Hays, L.; Morgan, W. F. und Petrini, J. H. (1998): The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response, *Cell* (Band 93), Nr. 3, Seite 477-86.
- Chrzanowska, K. H.; Kleijer, W. J.; Krajewska-Walasek, M.; Bialecka, M.; Gutkowska, A.; Goryluk-Kozakiewicz, B.; Michalkiewicz, J.; Stachowski, J.; Gregorek, H.; Lyson-Wojciechowska, G. und et al. (1995): Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome, *Am J Med Genet* (Band 57), Nr. 3, Seite 462-71.
- Cimprich, K. A.; Shin, T. B.; Keith, C. T. und Schreiber, S. L. (1996): cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 7, Seite 2850-5.
- Cliby, W. A.; Roberts, C. J.; Cimprich, K. A.; Stringer, C. M.; Lamb, J. R.; Schreiber, S. L. und Friend, S. H. (1998): Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints, *Embo J* (Band 17), Nr. 1, Seite 159-69.

- Collatz, K.-G. (2001): Apoptose, Lexikon der Biologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Crawford, T. O. (1998): Ataxia telangiectasia, *Semin Pediatr Neurol* (Band 5), Nr. 4, Seite 287-94.
- Cregan, S. P.; Fortin, A.; MacLaurin, J. G.; Callaghan, S. M.; Cecconi, F.; Yu, S. W.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Park, D. S.; Kroemer, G. und Slack, R. S. (2002): Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death, *J Cell Biol* (Band 158), Nr. 3, Seite 507-17.
- Crompton, N. E.; Shi, Y. Q.; Emery, G. C.; Wisser, L.; Blattmann, H.; Maier, A.; Li, L.; Schindler, D.; Ozsahin, H. und Ozsahin, M. (2001): Sources of variation in patient response to radiation treatment, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 49), Nr. 2, Seite 547-54.
- D'Amours, D. und Jackson, S. P. (2002): The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 3), Nr. 5, Seite 317-27.
- Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T. und Traganos, F. (1997): Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis), *Cytometry* (Band 27), Nr. 1, Seite 1-20.
- de Jager, M.; van Noort, J.; van Gent, D. C.; Dekker, C.; Kanaar, R. und Wyman, C. (2001): Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends, *Mol Cell* (Band 8), Nr. 5, Seite 1129-35.
- Demuth, I.; Frappart, P. O.; Hildebrand, G.; Melchers, A.; Lobitz, S.; Stockl, L.; Varon, R.; Herceg, Z.; Sperling, K.; Wang, Z. Q. und Digweed, M. (2004): An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability, *Hum Mol Genet* (Band 13), Nr. 20, Seite 2385-97.
- Digweed, M.; Reis, A. und Sperling, K. (1999): Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair, *Bioessays* (Band 21), Nr. 8, Seite 649-56.
- Digweed, M. und Sperling, K. (2004): Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks, *DNA Repair (Amst)* (Band 3), Nr. 8-9, Seite 1207-17.
- Distel, L.; Neubauer, S.; Varon, R.; Holter, W. und Grabenbauer, G. (2003): Fatal toxicity following radio- and chemotherapy of medulloblastoma in a child with unrecognized Nijmegen breakage syndrome, *Med Pediatr Oncol* (Band 41), Nr. 1, Seite 44-8.
- Duchaud, E.; Ridet, A.; Stoppa-Lyonnet, D.; Janin, N.; Moustacchi, E. und Rosselli, F. (1996): Deregulated apoptosis in ataxia telangiectasia: association with clinical stigmata and radiosensitivity, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 6, Seite 1400-4.

- el-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, W. E.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* (Band 75), Nr. 4, Seite 817-25.
- Fernet, M.; Angele, S.; Dork, T. und Hall, J. (2003): Variation in radiation-induced apoptosis in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cell lines, *Int J Radiat Biol* (Band 79), Nr. 3, Seite 193-202.
- Gatei, M.; Young, D.; Cerosaletti, K. M.; Desai-Mehta, A.; Spring, K.; Kozlov, S.; Lavin, M. F.; Gatti, R. A.; Concannon, P. und Khanna, K. (2000): ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure, *Nat Genet* (Band 25), Nr. 1, Seite 115-9.
- Genzlinger, A., Romanakis, K., Janzowski, C., Zankl, H. (1997): Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on bei 4 humanen Leukämiezelllinien sowie normalen Blutlymphozyten, 10. Heidelberger Zytometrie Symposium, Seite 75.
- Giaccia, A. J. und Kastan, M. B. (1998): The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 19, Seite 2973-83.
- Girard, P. M.; Foray, N.; Stumm, M.; Waugh, A.; Riballo, E.; Maser, R. S.; Phillips, W. P.; Petrini, J.; Arlett, C. F. und Jeggo, P. A. (2000): Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 17, Seite 4881-8.
- Girard, P. M.; Riballo, E.; Begg, A. C.; Waugh, A. und Jeggo, P. A. (2002): Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest, *Oncogene* (Band 21), Nr. 27, Seite 4191-9.
- Gregorek, H.; Chrzanowska, K. H.; Michalkiewicz, J.; Syczewska, M. und Madalinski, K. (2002): Heterogeneity of humoral immune abnormalities in children with Nijmegen breakage syndrome: an 8-year follow-up study in a single centre, *Clin Exp Immunol* (Band 130), Nr. 2, Seite 319-24.
- Han, Z.; Chatterjee, D.; He, D. M.; Early, J.; Pantazis, P.; Wyche, J. H. und Hendrickson, E. A. (1995): Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation, *Mol Cell Biol* (Band 15), Nr. 11, Seite 5849-57.
- Helt, C. E.; Cliby, W. A.; Keng, P. C.; Bambara, R. A. und O'Reilly, M. A. (2005): Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 2, Seite 1186-92.
- Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 770-6.
- Hirao, A.; Cheung, A.; Duncan, G.; Girard, P. M.; Elia, A. J.; Wakeham, A.; Okada, H.; Sarkissian, T.; Wong, J. A.; Sakai, T.; De Stanchina, E.; Bristow, R. G.; Suda, T.; Lowe, S. W.; Jeggo, P. A.; Elledge, S. J. und Mak, T. W. (2002): Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated

- (ATM)-dependent and an ATM-independent manner, *Mol Cell Biol* (Band 22), Nr. 18, Seite 6521-32.
- Hirao, A.; Kong, Y. Y.; Matsuoka, S.; Wakeham, A.; Ruland, J.; Yoshida, H.; Liu, D.; Elledge, S. J. und Mak, T. W. (2000): DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2, *Science* (Band 287), Nr. 5459, Seite 1824-7.
- Horejsi, Z.; Falck, J.; Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B.; Lukas, J. und Bartek, J. (2004): Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation, *Oncogene* (Band 23), Nr. 17, Seite 3122-7.
- Huang, J. und Dynan, W. S. (2002): Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction, *Nucleic Acids Res* (Band 30), Nr. 3, Seite 667-74.
- Humar, B.; Muller, H. und Scott, R. J. (1997): Elevated frequency of p53-independent apoptosis after irradiation increases levels of DNA breaks in ataxia telangiectasia lymphoblasts, *Int J Radiat Biol* (Band 72), Nr. 3, Seite 257-69.
- Igney, F. H. und Krammer, P. H. (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat Rev Cancer* (Band 2), Nr. 4, Seite 277-88.
- Iliakis, G.; Wang, Y.; Guan, J. und Wang, H. (2003): DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation, *Oncogene* (Band 22), Nr. 37, Seite 5834-47.
- Ito, A.; Tauchi, H.; Kobayashi, J.; Morishima, K.; Nakamura, A.; Hirokawa, Y.; Matsuura, S.; Ito, K. und Komatsu, K. (1999): Expression of full-length NBS1 protein restores normal radiation responses in cells from Nijmegen breakage syndrome patients, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 265), Nr. 3, Seite 716-21.
- Ivanov, E. L.; Korolev, V. G. und Fabre, F. (1992): XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination, *Genetics* (Band 132), Nr. 3, Seite 651-64.
- Jaspers, N. G.; Taalman, R. D. und Baan, C. (1988): Patients with an inherited syndrome characterized by immunodeficiency, microcephaly, and chromosomal instability: genetic relationship to ataxia telangiectasia, *Am J Hum Genet* (Band 42), Nr. 1, Seite 66-73.
- Jongmans, W.; Vuillaume, M.; Chrzanowska, K.; Smeets, D.; Sperling, K. und Hall, J. (1997): Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation, *Mol Cell Biol* (Band 17), Nr. 9, Seite 5016-22.
- Joza, N.; Kroemer, G. und Penninger, J. M. (2002): Genetic analysis of the mammalian cell death machinery, *Trends Genet* (Band 18), Nr. 3, Seite 142-9.

- Kang, J.; Bronson, R. T. und Xu, Y. (2002): Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair, *Embo J* (Band 21), Nr. 6, Seite 1447-55.
- Kawanishi, M. (1997): Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects Jurkat T cells from apoptosis induced by serum deprivation, *Virology* (Band 228), Nr. 2, Seite 244-50.
- Khanna, K. K.; Keating, K. E.; Kozlov, S.; Scott, S.; Gatei, M.; Hobson, K.; Taya, Y.; Gabrielli, B.; Chan, D.; Lees-Miller, S. P. und Lavin, M. F. (1998): ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction, *Nat Genet* (Band 20), Nr. 4, Seite 398-400.
- Khanna, K. K. und Lavin, M. F. (1993): Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells, *Oncogene* (Band 8), Nr. 12, Seite 3307-12.
- Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers, *Nature* (Band 386), Nr. 6627, Seite 761, 763.
- Kraakman-van der Zwet, M.; Overkamp, W. J.; Friedl, A. A.; Klein, B.; Verhaegh, G. W.; Jaspers, N. G.; Midro, A. T.; Eckardt-Schupp, F.; Lohman, P. H. und Zdzienicka, M. Z. (1999): immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts, *Mutat Res* (Band 434), Nr. 1, Seite 17-27.
- Kracker, S.; Bergmann, Y.; Demuth, I.; Frappart, P. O.; Hildebrand, G.; Christine, R.; Wang, Z. Q.; Sperling, K.; Digweed, M. und Radbruch, A. (2005): Nibrin functions in Ig class-switch recombination, *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Lakin, N. D.; Hann, B. C. und Jackson, S. P. (1999): The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53, *Oncogene* (Band 18), Nr. 27, Seite 3989-95.
- Lee, J. H. und Paull, T. T. (2004): Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex, *Science* (Band 304), Nr. 5667, Seite 93-6.
- Li, F. P. und Fraumeni, J. F., Jr. (1969): Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?, *Ann Intern Med* (Band 71), Nr. 4, Seite 747-52.
- Li, H.; Kolluri, S. K.; Gu, J.; Dawson, M. I.; Cao, X.; Hobbs, P. D.; Lin, B.; Chen, G.; Lu, J.; Lin, F.; Xie, Z.; Fontana, J. A.; Reed, J. C. und Zhang, X. (2000): Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3, *Science* (Band 289), Nr. 5482, Seite 1159-64.
- Lieber, M. R. (1999): The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes, *Genes Cells* (Band 4), Nr. 2, Seite 77-85.
- Lim, D. S.; Kim, S. T.; Xu, B.; Maser, R. S.; Lin, J.; Petrini, J. H. und Kastan, M. B. (2000): ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway, *Nature* (Band 404), Nr. 6778, Seite 613-7.

- Lizard, G.; Fournel, S.; Genestier, L.; Dhedin, N.; Chaput, C.; Flacher, M.; Mutin, M.; Panaye, G. und Revillard, J. P. (1995): Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis, *Cytometry* (Band 21), Nr. 3, Seite 275-83.
- Lombard, D. B. und Guarente, L. (2000): Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 9, Seite 2331-4.
- Lu, X. und Lane, D. P. (1993): Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?, *Cell* (Band 75), Nr. 4, Seite 765-78.
- Malkin, D.; Li, F. P.; Strong, L. C.; Fraumeni, J. F., Jr.; Nelson, C. E.; Kim, D. H.; Kassel, J.; Gryka, M. A.; Bischoff, F. Z.; Tainsky, M. A. und et al. (1990): Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science* (Band 250), Nr. 4985, Seite 1233-8.
- Maser, R. S.; Zinkel, R. und Petrini, J. H. (2001): An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele, *Nat Genet* (Band 27), Nr. 4, Seite 417-21.
- Matsuoka, S.; Rotman, G.; Ogawa, A.; Shiloh, Y.; Tamai, K. und Elledge, S. J. (2000): Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 19, Seite 10389-94.
- Matsuura, K.; Balmukhanov, T.; Tauchi, H.; Weemaes, C.; Smeets, D.; Chrzanowska, K.; Endou, S.; Matsuura, S. und Komatsu, K. (1998): Radiation induction of p53 in cells from Nijmegen breakage syndrome is defective but not similar to ataxia-telangiectasia, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 242), Nr. 3, Seite 602-7.
- Matsuura, S.; Tauchi, H.; Nakamura, A.; Kondo, N.; Sakamoto, S.; Endo, S.; Smeets, D.; Solder, B.; Belohradsky, B. H.; Der Kaloustian, V. M.; Oshimura, M.; Isomura, M.; Nakamura, Y. und Komatsu, K. (1998): Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome, *Nat Genet* (Band 19), Nr. 2, Seite 179-81.
- Mazur, L.; Augustynek, A.; Deptala, A.; Halicka, H. D. und Bedner, E. (2002): Effects of WR-2721 and cyclophosphamide on the cell cycle phase specificity of apoptosis in mouse bone marrow, *Anticancer Drugs* (Band 13), Nr. 7, Seite 751-8.
- Meijer, A. E.; Ekedahl, J.; Joseph, B.; Castro, J.; Harms-Ringdahl, M.; Zhivotovsky, B. und Lewensohn, R. (2001): High-LET radiation induces apoptosis in lymphoblastoid cell lines derived from ataxia-telangiectasia patients, *Int J Radiat Biol* (Band 77), Nr. 3, Seite 309-17.
- Meijer, A. E.; Zhivotovsky, B. und Lewensohn, R. (1999): Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines of ataxia telangiectasia patients are defective in X-ray-induced apoptosis, *Int J Radiat Biol* (Band 75), Nr. 6, Seite 709-16.

- Melchionna, R.; Chen, X. B.; Blasina, A. und McGowan, C. H. (2000): Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1, *Nat Cell Biol* (Band 2), Nr. 10, Seite 762-5.
- Melino, G.; Bernassola, F.; Ranalli, M.; Yee, K.; Zong, W. X.; Corazzari, M.; Knight, R. A.; Green, D. R.; Thompson, C. und Vousden, K. H. (2004): p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 9, Seite 8076-83.
- Meyn, M. S.; Strasfeld, L. und Allen, C. (1994): Testing the role of p53 in the expression of genetic instability and apoptosis in ataxia-telangiectasia, *Int J Radiat Biol* (Band 66), Nr. 6 Suppl, Seite S141-9.
- Mihara, M.; Erster, S.; Zaika, A.; Petrenko, O.; Chittenden, T.; Pancoska, P. und Moll, U. M. (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria, *Mol Cell* (Band 11), Nr. 3, Seite 577-90.
- Nagata, S. und Golstein, P. (1995): The Fas death factor, *Science* (Band 267), Nr. 5203, Seite 1449-56.
- Nakanishi, K.; Taniguchi, T.; Ranganathan, V.; New, H. V.; Moreau, L. A.; Stotsky, M.; Mathew, C. G.; Kastan, M. B.; Weaver, D. T. und D'Andrea, A. D. (2002): Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response, *Nat Cell Biol* (Band 4), Nr. 12, Seite 913-20.
- Nelms, B. E.; Maser, R. S.; MacKay, J. F.; Lagally, M. G. und Petrini, J. H. (1998): In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts, *Science* (Band 280), Nr. 5363, Seite 590-2.
- Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M. C.; Grignani, F. und Riccardi, C. (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J Immunol Methods* (Band 139), Nr. 2, Seite 271-9.
- Norbury, C. J. und Zhivotovsky, B. (2004): DNA damage-induced apoptosis, *Oncogene* (Band 23), Nr. 16, Seite 2797-808.
- Nove, J.; Little, J. B.; Mayer, P. J.; Troilo, P. und Nichols, W. W. (1986): Hypersensitivity of cells from a new chromosomal-breakage syndrome to DNA-damaging agents, *Mutat Res* (Band 163), Nr. 3, Seite 255-62.
- o.V. (2004): Cell death - Apoptosis and Necrosis, Roche Applied Science: Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation Manual (Band 3), Seite 2.
- O'Driscoll, M.; Ruiz-Perez, V. L.; Woods, C. G.; Jeggo, P. A. und Goodship, J. A. (2003): A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome, *Nat Genet* (Band 33), Nr. 4, Seite 497-501.
- Owen-Schaub, L. B.; Zhang, W.; Cusack, J. C.; Angelo, L. S.; Santee, S. M.; Fujiwara, T.; Roth, J. A.; Deisseroth, A. B.; Zhang, W. W.; Kruzel, E. und et al. (1995):

- Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression, *Mol Cell Biol* (Band 15), Nr. 6, Seite 3032-40.
- Pan, H.; Yin, C.; Dyson, N. J.; Harlow, E.; Yamasaki, L. und Van Dyke, T. (1998): Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors, *Mol Cell* (Band 2), Nr. 3, Seite 283-92.
- Paull, T. T. und Gellert, M. (1998): The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks, *Mol Cell* (Band 1), Nr. 7, Seite 969-79.
- Perez-Vera, P.; Gonzalez-del Angel, A.; Molina, B.; Gomez, L.; Frias, S.; Gatti, R. A. und Carnevale, A. (1997): Chromosome instability with bleomycin and X-ray hypersensitivity in a boy with Nijmegen breakage syndrome, *Am J Med Genet* (Band 70), Nr. 1, Seite 24-7.
- Powers, J. T.; Hong, S.; Mayhew, C. N.; Rogers, P. M.; Knudsen, E. S. und Johnson, D. G. (2004): E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis, *Mol Cancer Res* (Band 2), Nr. 4, Seite 203-14.
- Ramel, S.; Sanchez, C. A.; Schimke, M. K.; Neshat, K.; Cross, S. M.; Raskind, W. H. und Reid, B. J. (1995): Inactivation of p53 and the development of tetraploidy in the elastase-SV40 T antigen transgenic mouse pancreas, *Pancreas* (Band 11), Nr. 3, Seite 213-22.
- Ranganathan, V.; Heine, W. F.; Ciccone, D. N.; Rudolph, K. L.; Wu, X.; Chang, S.; Hai, H.; Ahearn, I. M.; Livingston, D. M.; Resnick, I.; Rosen, F.; Seemanova, E.; Jarolim, P.; DePinho, R. A. und Weaver, D. T. (2001): Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit, *Curr Biol* (Band 11), Nr. 12, Seite 962-6.
- Rattray, A. J. und Symington, L. S. (1995): Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* (Band 139), Nr. 1, Seite 45-56.
- Rogoff, H. A.; Pickering, M. T.; Frame, F. M.; Debatis, M. E.; Sanchez, Y.; Jones, S. und Kowalik, T. F. (2004): Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2, *Mol Cell Biol* (Band 24), Nr. 7, Seite 2968-77.
- Saar, K.; Chrzanowska, K. H.; Stumm, M.; Jung, M.; Nurnberg, G.; Wienker, T. F.; Seemanova, E.; Wegner, R. D.; Reis, A. und Sperling, K. (1997): The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21, *Am J Hum Genet* (Band 60), Nr. 3, Seite 605-10.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7.
- Seemanova, E.; Passarge, E.; Beneskova, D.; Houstek, J.; Kasal, P. und Sevcikova, M. (1985): Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder, *Am J Med Genet* (Band 20), Nr. 4, Seite 639-48.

- Seidemann, K.; Henze, G.; Beck, J. D.; Sauerbrey, A.; Kuhl, J.; Mann, G. und Reiter, A. (2000): Non-Hodgkin's lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials, *Ann Oncol* (Band 11 Suppl 1), Seite 141-5.
- Seki, H.; Kanegane, H.; Iwai, K.; Konno, A.; Ohta, K.; Yachie, A.; Taniguchi, N. und Miyawaki, T. (1994): Ionizing radiation induces apoptotic cell death in human TcR-gamma/delta+ T and natural killer cells without detectable p53 protein, *Eur J Immunol* (Band 24), Nr. 11, Seite 2914-7.
- She, Q. B.; Chen, N. und Dong, Z. (2000): ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 27, Seite 20444-9.
- She, Q. B.; Ma, W. Y. und Dong, Z. (2002): Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20, *Oncogene* (Band 21), Nr. 10, Seite 1580-9.
- Shi, Y. Q.; Li, L.; Sanal, O.; Tezcan, I.; Emery, G. C.; Blattmann, H. und Crompton, N. E. (2001): High levels of delayed radiation-induced apoptosis observed in lymphoblastoid cell lines from ataxia-telangiectasia patients, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 49), Nr. 2, Seite 555-9.
- Shigeta, T.; Takagi, M.; Delia, D.; Chessa, L.; Iwata, S.; Kanke, Y.; Asada, M.; Eguchi, M. und Mizutani, S. (1999): Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations, *Cancer Res* (Band 59), Nr. 11, Seite 2602-7.
- Shiloh, Y. (2001): ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage, *Curr Opin Genet Dev* (Band 11), Nr. 1, Seite 71-7.
- Shiloh, Y. (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, *Nat Rev Cancer* (Band 3), Nr. 3, Seite 155-68.
- Siwicki, J. K.; Degerman, S.; Chrzanowska, K. H. und Roos, G. (2003): Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell lines from Nijmegen breakage syndrome patients, *Exp Cell Res* (Band 287), Nr. 1, Seite 178-89.
- Stary, A. und Sarasin, A. (2002): The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome, *Biochimie* (Band 84), Nr. 1, Seite 49-60.
- Steffen, J.; Varon, R.; Mosor, M.; Maneva, G.; Maurer, M.; Stumm, M.; Nowakowska, D.; Rubach, M.; Kosakowska, E.; Ruka, W.; Nowecki, Z.; Rutkowski, P.; Demkow, T.; Sadowska, M.; Bidzinski, M.; Gawrychowski, K. und Sperling, K. (2004): Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland, *Int J Cancer* (Band 111), Nr. 1, Seite 67-71.
- Stiff, T.; Reis, C.; Alderton, G. K.; Woodbine, L.; O'Driscoll, M. und Jeggo, P. A. (2004): Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events, *Embo J*

- Stiff, T.; Reis, C.; Alderton, G. K.; Woodbine, L.; O'Driscoll, M. und Jeggo, P. A. (2005): Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events, *Embo J* (Band 24), Nr. 1, Seite 199-208.
- Stumm, M.; Gatti, R. A.; Reis, A.; Udar, N.; Chrzanowska, K.; Seemanova, E.; Sperling, K. und Wegner, R. D. (1995): The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1, *Am J Hum Genet* (Band 57), Nr. 4, Seite 960-2.
- Sullivan, K. E.; Veksler, E.; Lederman, H. und Lees-Miller, S. P. (1997): Cell cycle checkpoints and DNA repair in Nijmegen breakage syndrome, *Clin Immunol Immunopathol* (Band 82), Nr. 1, Seite 43-8.
- Taalman, R. D.; Jaspers, N. G.; Scheres, J. M.; de Wit, J. und Hustinx, T. W. (1983): Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome, *Mutat Res* (Band 112), Nr. 1, Seite 23-32.
- Tahara, H.; Tokutake, Y.; Maeda, S.; Kataoka, H.; Watanabe, T.; Satoh, M.; Matsumoto, T.; Sugawara, M.; Ide, T.; Goto, M.; Furuichi, Y. und Sugimoto, M. (1997): Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus, *Oncogene* (Band 15), Nr. 16, Seite 1911-20.
- Takata, M.; Sasaki, M. S.; Sonoda, E.; Morrison, C.; Hashimoto, M.; Utsumi, H.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Shinohara, A. und Takeda, S. (1998): Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *Embo J* (Band 17), Nr. 18, Seite 5497-508.
- Tauchi, H.; Kobayashi, J.; Morishima, K.; van Gent, D. C.; Shiraishi, T.; Verkaik, N. S.; vanHeems, D.; Ito, E.; Nakamura, A.; Sonoda, E.; Takata, M.; Takeda, S.; Matsuura, S. und Komatsu, K. (2002): Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells, *Nature* (Band 420), Nr. 6911, Seite 93-8.
- Tauchi, H.; Matsuura, S.; Kobayashi, J.; Sakamoto, S. und Komatsu, K. (2002): Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability, *Oncogene* (Band 21), Nr. 58, Seite 8967-80.
- Taylor, A. M.; Metcalfe, J. A.; Thick, J. und Mak, Y. F. (1996): Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia, *Blood* (Band 87), Nr. 2, Seite 423-38.
- The_International_Nijmegen-Breakage-Syndrome_Study_Group (2000): Nijmegen breakage syndrome., *Arch Dis Child* (Band 82), Nr. 5, Seite 400-6.
- Thornberry, N. A. und Lazebnik, Y. (1998): Caspases: enemies within, *Science* (Band 281), Nr. 5381, Seite 1312-6.
- Tibbetts, R. S.; Brumbaugh, K. M.; Williams, J. M.; Sarkaria, J. N.; Cliby, W. A.; Shieh, S. Y.; Taya, Y.; Prives, C. und Abraham, R. T. (1999): A role for ATR in the DNA

- damage-induced phosphorylation of p53, *Genes Dev* (Band 13), Nr. 2, Seite 152-7.
- Tinel, A. und Tschopp, J. (2004): The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress, *Science* (Band 304), Nr. 5672, Seite 843-6.
- Trujillo, K. M.; Yuan, S. S.; Lee, E. Y. und Sung, P. (1998): Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 34, Seite 21447-50.
- Uziel, T.; Lerenthal, Y.; Moyal, L.; Andegeko, Y.; Mittelman, L. und Shiloh, Y. (2003): Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage, *Embo J* (Band 22), Nr. 20, Seite 5612-21.
- Van de Kaa, C. A.; Weemaes, C. M.; Wesseling, P.; Schaafsma, H. E.; Haraldsson, A. und De Weger, R. A. (1994): Postmortem findings in the Nijmegen breakage syndrome, *Pediatr Pathol* (Band 14), Nr. 5, Seite 787-96.
- van der Burgt, I.; Chrzanowska, K. H.; Smeets, D. und Weemaes, C. (1996): Nijmegen breakage syndrome, *J Med Genet* (Band 33), Nr. 2, Seite 153-6.
- van Engeland, M.; Nieland, L. J.; Ramaekers, F. C.; Schutte, B. und Reutelingsperger, C. P. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry* (Band 31), Nr. 1, Seite 1-9.
- van Engelen, B. G.; Hiel, J. A.; Gabreels, F. J.; van den Heuvel, L. P.; van Gent, D. C. und Weemaes, C. M. (2001): Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect, *Hum Immunol* (Band 62), Nr. 12, Seite 1324-7.
- Varon, R.; Seemanova, E.; Chrzanowska, K.; Hnateyko, O.; Piekutowska-Abramczuk, D.; Krajewska-Walasek, M.; Sykut-Cegielska, J.; Sperling, K. und Reis, A. (2000): Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations, *Eur J Hum Genet* (Band 8), Nr. 11, Seite 900-2.
- Varon, R.; Vissinga, C.; Platzer, M.; Cerosaletti, K. M.; Chrzanowska, K. H.; Saar, K.; Beckmann, G.; Seemanova, E.; Cooper, P. R.; Nowak, N. J.; Stumm, M.; Weemaes, C. M.; Gatti, R. A.; Wilson, R. K.; Digweed, M.; Rosenthal, A.; Sperling, K.; Concannon, P. und Reis, A. (1998): Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome, *Cell* (Band 93), Nr. 3, Seite 467-76.
- Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J Immunol Methods* (Band 184), Nr. 1, Seite 39-51.

- Vernole, P.; Tedeschi, B.; Caporossi, D.; Maccarrone, M.; Melino, G. und Annicchiarico-Petruzzelli, M. (1998): Induction of apoptosis by bleomycin in resting and cycling human lymphocytes, *Mutagenesis* (Band 13), Nr. 3, Seite 209-15.
- Vidair, C. A.; Chen, C. H.; Ling, C. C. und Dewey, W. C. (1996): Apoptosis induced by X-irradiation of rec-myc cells is postmitotic and not predicted by the time after irradiation or behavior of sister cells, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 18, Seite 4116-8.
- Vogelstein, B.; Lane, D. und Levine, A. J. (2000): Surfing the p53 network, *Nature* (Band 408), Nr. 6810, Seite 307-10.
- Vousden, K. H. und Lu, X. (2002): Live or let die: the cell's response to p53, *Nat Rev Cancer* (Band 2), Nr. 8, Seite 594-604.
- Weemaes, C. M.; Hustinx, T. W.; Scheres, J. M.; van Munster, P. J.; Bakkeren, J. A. und Taalman, R. D. (1981): A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome, *Acta Paediatr Scand* (Band 70), Nr. 4, Seite 557-64.
- Weemaes, C. M.; Smeets, D. F. und van der Burgt, C. J. (1994): Nijmegen Breakage syndrome: a progress report, *Int J Radiat Biol* (Band 66), Nr. 6 Suppl, Seite S185-8.
- Williams, B. R.; Mirzoeva, O. K.; Morgan, W. F.; Lin, J.; Dunnick, W. und Petrini, J. H. (2002): A murine model of Nijmegen breakage syndrome, *Curr Biol* (Band 12), Nr. 8, Seite 648-53.
- Wu, X.; Ranganathan, V.; Weisman, D. S.; Heine, W. F.; Ciccone, D. N.; O'Neill, T. B.; Crick, K. E.; Pierce, K. A.; Lane, W. S.; Rathbun, G.; Livingston, D. M. und Weaver, D. T. (2000): ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response, *Nature* (Band 405), Nr. 6785, Seite 477-82.
- Wyllie, A. H. (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature* (Band 284), Nr. 5756, Seite 555-6.
- Wyllie, A. H.; Kerr, J. F. und Currie, A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol* (Band 68), Seite 251-306.
- Xu, B.; Kim, S. und Kastan, M. B. (2001): Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation, *Mol Cell Biol* (Band 21), Nr. 10, Seite 3445-50.
- Yamazaki, V.; Wegner, R. D. und Kirchgessner, C. U. (1998): Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells, *Cancer Res* (Band 58), Nr. 11, Seite 2316-22.
- Yang, S.; Kuo, C.; Bisi, J. E. und Kim, M. K. (2002): PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2, *Nat Cell Biol* (Band 4), Nr. 11, Seite 865-70.

- Zhan, Q.; Carrier, F. und Fornace, A. J., Jr. (1993): Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest, *Mol Cell Biol* (Band 13), Nr. 7, Seite 4242-50.
- Zhang, Y.; Dimtchev, A.; Dritschilo, A. und Jung, M. (2001): Ionizing radiation-induced apoptosis in ataxia-telangiectasia fibroblasts. Roles of caspase-9 and cellular inhibitor of apoptosis protein-1, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 31, Seite 28842-8.
- Zhao, R.; Gish, K.; Murphy, M.; Yin, Y.; Notterman, D.; Hoffman, W. H.; Tom, E.; Mack, D. H. und Levine, A. J. (2000): Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 8, Seite 981-93.
- Zhao, S.; Weng, Y. C.; Yuan, S. S.; Lin, Y. T.; Hsu, H. C.; Lin, S. C.; Gerbino, E.; Song, M. H.; Zdzienicka, M. Z.; Gatti, R. A.; Shay, J. W.; Ziv, Y.; Shiloh, Y. und Lee, E. Y. (2000): Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products, *Nature* (Band 405), Nr. 6785, Seite 473-7.
- Zhou, M.; Gu, L.; Li, F.; Zhu, Y.; Woods, W. G. und Findley, H. W. (2002): DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 303), Nr. 1, Seite 124-31.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 13.5.2005

Nadja Thierfelder

Danksagung

Besonders herzlich danken möchte ich Professor Dr. Martin Digweed, in dessen Arbeitsgruppe und unter dessen Leitung dieses Projekt durchgeführt wurde. Die motivierenden und ergebnisorientierten Gespräche mit ihm haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Ilja Demuth für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und die gute fachliche Beratung in jedweder wissenschaftlichen Angelegenheit.

Ich danke Professor Dr. Karl Sperling, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen und der die Entwicklungen stets mit großem Interesse verfolgte. Besonders bereichernd war für mich die Teilnahme an Kongressen in Prag und Halle, die ich ihm und Frau Corinna Krüger zu verdanken habe.

Herzlich danken möchte ich auch Gabriele Hildebrand, Susanne Rothe und Janina Radszewski für die Vermittlung zahlreicher Methoden, ihre unermüdliche Geduld und ihr offenes Ohr für alle meine Fragen zur technischen Durchführung dieser Arbeit. Die freundliche Arbeitsatmosphäre dank aller Labormitarbeiter werde ich schon sehr bald vermissen. Bei Karin Schmelz möchte ich mich für die kompetente Unterstützung am Durchflussszytometer bedanken.

Frau Professor Dr. E. Seemanova danke ich für die Bereitstellung von Patientenzellen und klinischen Daten. Besonders bedanke ich mich bei allen NBS-Patienten, die Blutproben für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt und diese Arbeit somit ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt meinem Bruder Kolja Thierfelder für die geduldige und tatkräftige Unterstützung in allen Computerfragen, insbesondere bei der Anfertigung der Abbildungen. Meinen Eltern Maja Wever-Thierfelder und Horst Thierfelder, meinen Großeltern und meinem Freund Christof Gemke möchte ich herzlich für ihre Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit danken.